

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**VALOR PRONÓSTICO DE LA COEXPRESIÓN DE
LOS RECEPTORES DE CRECIMIENTO
EPIDÉRMICO EGFR Y *c-erbB-2* EN EL CARCINOMA
LOCALMENTE AVANZADO DE CÉRVIX**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ALFONSO SÁNCHEZ MUÑOZ

Directores:

**José Pérez-Regadera Gómez
José María Aguado García**

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-7800-7

© Alfonso Sánchez Muñoz, 2010

**VALOR PRONÓSTICO DE LA COEXPRESIÓN DE
LOS RECEPTORES DE CRECIMIENTO
EPIDÉRMICO EGFR Y *c-erbB-2* EN EL CARCINOMA
LOCALMENTE AVANZADO DE CÉRVIX.**

Doctorando:

Alfonso Sánchez Muñoz.

Directores:

José Pérez-Regadera Gómez.

José María Aguado García

**Servicio de Oncología Médica
Hospital Clínico de Málaga
Noviembre 2009**

“Es frecuente que el hombre que ama su profesión por sí misma saque sus más vivos deleites de las manifestaciones menos importantes y más humildes de la misma.”

Arthur Conan Doyle.

COMISIÓN DE DOCTORADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA I
DE LA UCM

A la vista de la información existente sobre el trabajo realizado por

D. Alfonso Sánchez Muñoz

Titulado: **“VALOR PRONÓSTICO DE LA COEXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO EGFR Y c-erbB-2 EN EL CARCINOMA LOCALMENTE AVANZADO DE CÉRVIX”**

La Comisión responsable del Doctorado en el Departamento de Medicina considera que se trata de un trabajo de investigación clínica original de su autor, que se ajusta a las NORMAS DE CALIDAD APROBADAS POR ESTE DEPARTAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE LAS TESIS DOCTORALES (cuya copia se adjunta) y cumple los requisitos metodológicos científicos necesarios para su admisión al trámite de lectura como tesis doctoral.

Lo que firmo en Madrid, a 20 de noviembre de 2009

Director
Departamento de Medicina
Prof. D. Rafael Enríquez de Salamanca

Director Dpto. Medicina

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer al Dr José Pérez-Regadera Gómez su amistad y su trabajo en la elaboración de esta tesis, y al Dr José Maria Aguado García como codirector de la misma.

A mis padres, a mi mujer Angeles y a mi hermana María Isabel por su cariño, paciencia y apoyo incondicional siempre.

A mi gran maestro de la medicina el Profesor Eduardo Rosario Díaz por formarme como médico en los primeros años de mi profesión.

A todas las personas que componen el Servicio de Radioterapia del Hospital 12 Octubre de Madrid, y en especial al Dr Eduardo Lanzós por tratarme como a uno de sus residentes durante mi rotación por su servicio, en el que aprendí el importante valor terapéutico de la radioterapia en el manejo del enfermo oncológico.

A la Unidad de Epidemiología - Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, y en especial a David Lora y Javier de la Cruz por su inestimable colaboración en el análisis estadístico de los resultados.

Al Dr Claudio Ballestín miembro del Departamento de Patología del Hospital 12 Octubre de Madrid, que dedicó parte de su tiempo para que esta tesis se realizara.

A los Servicios de Oncología Médica de los Hospitales 12 Octubre de Madrid, Ciudad de Jaén, y Clínico de Málaga por su ayuda en mi formación como oncológica médico.

A mi amigo Cesar Mendiola que me transmitió los primeros pasos en la Oncología.

A todas las pacientes que han hecho posible la realización de esta tesis, y que son la única razón de este trabajo.

A todos aquellos médicos que día a día tratan de poner su grano de arena en el avance del conocimiento de esa dura enfermedad como es el cáncer.

ÍNDICE

Justificación.....	8
Carcinoma de cérvix uterino.....	10
- Epidemiología y etiología.....	10
- Historia natural.....	11
- Estudio extensión. Estadíaje.....	14
- Tratamiento del cáncer de cérvix.....	16
Factores pronósticos en el cáncer de cérvix.....	20
Expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico en tumores sólidos.....	24
Expresión del receptor de factor de crecimiento epidérmico en el cáncer de cérvix.....	26
Expresión <i>c-erbB-2</i> en tumores sólidos.....	31
Expresión del <i>c-erbB-2</i> en el cáncer de cérvix.....	32
Hipótesis y objetivos.....	35
Material y método.....	36
- Población estudiada.....	36
- Tratamiento radioterápico.....	36
- Tratamiento quimioterápico.....	37
- Seguimiento de las pacientes.....	37
- Análisis moleculares.....	38
- Análisis estadístico.....	39
Resultados.....	41
- Análisis de las pacientes.....	41
- Respuesta a la quimioradioterapia concurrente.....	44
- Resultados del seguimiento de las pacientes.....	45
- Patrón de recaída en función de la sobreexpresión de EGFR y <i>c-erbB-2</i> , y de su coexpresión.....	47
- Relación entre coexpresión de EGFR y / o <i>c-erbB-2</i> y las variables pronósticas clásicas.....	50
- Análisis univariante para la supervivencia libre de enfermedad de los factores pronósticos estudiados.....	51
- Análisis multivariante para la supervivencia libre de enfermedad de los factores pronósticos estudiados.....	62

- Análisis univariante para la supervivencia libre de fracaso pélvico de los factores pronósticos estudiados.....	65
- Análisis multivariante para la supervivencia libre de fracaso pélvico de los factores pronósticos estudiados.....	75
Discusión.....	78
- Pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix localmente avanzado: características y análisis de los factores pronósticos clásicos estudiados. Respuesta al tratamiento quimioradioterápico concurrente.....	78
- Valor pronóstico de EGFR en el cáncer de cérvix.....	81
- Valor pronóstico de <i>c-erbB-2</i> en el cáncer de cérvix.....	84
- Importancia de la coexpresión de EGFR y <i>c-erbB-2</i> en el cáncer de cérvix; efecto de la dimerización.....	86
- Nuevas enfoques terapéuticos en el cáncer de cérvix a partir de estos resultados.....	88
Conclusiones.....	90
Bibliografía.....	91
Anexo I. Publicaciones relacionadas con la tesis.....	109

1. JUSTIFICACIÓN

El carcinoma de cérvix engloba un grupo complejo de tumores cuyo comportamiento no es uniforme en cuanto a su evolución clínica ni a la respuesta a los diversos tratamientos. En los últimos años se han desarrollado avances en el diagnóstico precoz del cáncer de cérvix a partir de la citología cervico-vaginal, y en el tratamiento de los carcinomas avanzados mediante el uso concomitante de quimioterapia y radioterapia. Aún así, el cáncer de cérvix continúa siendo el tumor más frecuente y la primera causa de mortalidad por cáncer en las mujeres de países con un mal desarrollo socio-económico e higiénico. Alrededor del 50% de las enfermas diagnosticadas de un carcinoma invasivo de cérvix fallecerán debido a la aparición de recidivas locales del tumor o por metástasis a distancia.

Como en otras neoplasias, en el carcinoma de cérvix resulta de trascendental importancia conocer cual será la evolución de las pacientes mediante la definición de factores pronósticos, y cual será su comportamiento ante un determinado tratamiento mediante la determinación de factores predictivos de respuesta. Disponemos de factores clínico-patológicos clásicos aceptados a través de los cuales intentamos establecer el curso evolutivo de la enfermedad, pero su utilidad es limitada.

Se han estudiado el papel pronóstico de diferentes marcadores moleculares en el cáncer de cérvix, entre ellos la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico. Esta familia está constituida por 4 miembros: ErbB-1 o Her-1 (EGFR propiamente), ErbB-2 (*c-erbB-2*), ErbB-3 (Her-3) y ErbB-4 (Her-4), íntimamente relacionados entre sí, que intervienen en la patogenia de los tumores sólidos a través del control del ciclo celular, de la apoptosis, de la angiogénesis, y de la capacidad de invasión y metástasis.

EGFR es una glicoproteína transductora de membrana de 170 kDa, codificada por un protooncogén localizado en el cromosoma 7p12. EGFR se encuentra sobreexpresado en el cáncer de cérvix entre 6-90% de los casos, según los diferentes estudios, y se correlaciona con un mal pronóstico, aunque para otros autores esta afirmación es aún cuestionable.

c-erbB-2 es una glicoproteína transmembranosa de 185 kDa, codificada por un protooncogén localizado en el cromosoma 17q23, sobreexpresada entre 12%-70% de los cánceres de cérvix. La sobreexpresión de *c-erbB-2* se asocia con estadios más avanzados y un peor pronóstico. Sin embargo, estos resultados aún son controvertidos.

Esta variabilidad en la expresión de ambas glicoproteínas y en su significado pronóstico en el cáncer de cérvix puede ser explicada, al menos en parte, por la diversidad de métodos de medición usados, y la heterogeneidad de poblaciones estudiadas con una mezcla de diferentes tratamientos administrados. Por otro lado, la sobreexpresión de un solo receptor por sí mismo pudiera ser insuficiente para la transformación oncogénica y se necesitaría la colaboración de al menos dos receptores y de ligandos apropiados. Los heterodímeros constituidos por EGFR y *c-erbB-2* son más potentes que los homodímeros de EGFR, debido a que *c-erbB-2* aumenta la afinidad por la unión de EGFR al ligando, reduce la disociación del ligando y favorece su reciclaje. Todo ello trae consigo una activación más intensa y sobre todo más prolongada de las señales de crecimiento y proliferación celular.

Nuestro trabajo es el primero que estudia el impacto pronóstico de la coexpresión de EGFR y *c-erbB-2* en la supervivencia libre de enfermedad y en la supervivencia libre de fracaso pélvico en pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix con estadios localmente avanzados no operadas, y tratadas con quimioterapia y radioterapia concurrente. La identificación de subgrupos de pacientes con una peor evolución clínica es crucial a la hora de proponer y estudiar nuevos enfoques terapéuticos que actúan sobre moléculas involucradas en las vías de transducción de señales del EGFR.

2. CARCINOMA DE CÉRVIX UTERINO

EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA

El carcinoma de cérvix es el segundo tumor más frecuente en la mujer. Unas 500.000 mujeres son diagnosticadas cada año de cáncer de cérvix en el mundo (1). En nuestro medio, la incidencia anual es de 8 casos por cada 100.000 mujeres, representa el 4% de los cánceres en la mujer, y el 2% de su mortalidad.

La utilización de la citología como técnica de diagnóstico precoz (frotis de Papanicolau) ha descendido la tasa de mortalidad del carcinoma de cérvix hasta un 70 % en los últimos 40 años en los países desarrollados (2). Sin embargo, el cáncer de cérvix continúa siendo el tumor más frecuente y la principal causa de muerte por cáncer en las mujeres de países con menor desarrollo higiénico y sanitario, como Latinoamérica, México, países africanos al sur del Sahara y sudeste asiático, desde donde cada vez hay mayor flujo migratorio de población a zonas como España (3). La aparición de una vacuna polivalente frente a los serotipos de VPH de alto riesgo para el desarrollo del cáncer de cérvix podría disminuir mucho la incidencia del cáncer de cérvix e incluso eliminar la necesidad de un *screening* masivo (4).

La mayoría de las pacientes son diagnosticadas en estadios precoces. Ello permite la aplicación de tratamientos oncológicos locoregionales con intención curativa. Pero aproximadamente la mitad de las enfermas fallecerán a consecuencia de las recidivas locales o metástasis a distancia. Con la excepción de las recurrencias pélvicas que pueden ser rescatadas con cirugía o radioterápico, la mayoría de las pacientes con enfermedad metastásica o recurrente serán candidatas a un tratamiento quimioterápico paliativo.

Otro aspecto de interés en el momento actual y sin una clara explicación, es el aumento de la frecuencia de este tumor en algunos países clásicamente considerados como de baja incidencia, en mujeres de menos de cincuenta años, y a expensas fundamentalmente de la histología de adenocarcinomas y tumores adenoescamosos (entre el 10% y 15% del total de los carcinomas de cérvix (5, 6, 7).

La incidencia del cáncer de cérvix es mayor en aquellas mujeres que tuvieron su primera relación sexual antes de los dieciséis años, que han tenido varios compañeros de relación y enfermedades venéreas asociadas. Este patrón epidemiológico es característico de la infección primaria por el virus del papilomavirus humano (VPH) que es detectado en casi la totalidad de los carcinomas de cérvix (99%). Los serotipos 16, 18, 31, 35 y 39 se asocian principalmente con el proceso de transformación maligna (5,8). La infección del serotipo 18 evoluciona con un especial mal pronóstico en cuanto a la supervivencia.

La infección por VPH de alto riesgo puede producir al menos tres alteraciones fundamentales en la biología celular que determinan la transformación maligna:

- Las oncoproteínas de los genes virales E6 y E7, se integran en el genoma de la célula y son capaces de inactivar las proteínas de los genes supresores p53 (9,

10, 11) y del retinoblastoma (Rb) (12, 13, 14) respectivamente, o bien activar oncogenes como la vía del EGFR (15-18).

- Las oncoproteínas virales E6 y E7 activan la enzima telomerasa, relacionada con el potencial ilimitado de replicación de las células neoplásicas (19).
- Las oncoproteínas E6 y E7 intervienen en la duplicación de los centrosomas, uno de los mecanismos implicados en la inestabilidad genómica (20,21).

Sin embargo, también existen infecciones por serotipos de bajo riesgo de VPH en mujeres que nunca desarrollarán un carcinoma de cérvix. Por tanto, la infección viral no es suficiente para el desarrollo del cáncer de cérvix y pueden existir otros cofactores (anticonceptivos orales, tabaquismo, deficiente higiene sexual, situaciones de inmunodeficiencia, sobre todo celular como la infección del HIV) que actúan sinérgicamente y modulan la infección viral.

En el momento actual se está estudiando la importancia en la génesis y progresión del cáncer de cérvix, de determinados oncogenes (*c-myc*, *ras*), genes supresores (ciclinas dependientes de kinasas, ciclinas, p16, p21, p27, *bcl-2*, MDM2, aparte de los ya citados p53 y Rb), receptores de factores de crecimiento epidérmicos (EGFR, *c-erb-B2*) y receptores de factores angiogénicos (VEGFR), a través de la alteración en la regulación del ciclo celular, de la apoptosis, y de la angiogénesis, y sus posibles interacciones con las oncoproteínas virales del VPH (22).

HISTORIA NATURAL

El límite entre el epitelio escamoso que reviste el exocérnix y el epitelio cilíndrico que reviste el endocérnix, constituye la unión escamo-cilíndrica cuya topografía varía a lo largo de la vida de la mujer y es aquí dónde se producen las lesiones intraepiteliales que pueden evolucionar a carcinoma invasor. Las lesiones intraepiteliales incluyen todos los cambios premalignos desde las alteraciones morfológicas originadas por la infección viral hasta el carcinoma *in situ*. Los estadios sucesivos son la displasia leve, moderada, severa y carcinoma *in situ*. De todos los carcinomas de cérvix diagnosticados, dos tercios son *in situ* y sólo un tercio son infiltrantes o invasivos.

La clasificación de Bethesda del National Cancer Institute (NCI), revisada en 2001, (tabla 1) creó una terminología uniforme en los resultados de las citologías y biopsias de cérvix que evitase definiciones descriptivas ambiguas anteriores y de significado clínico incierto. Existen dos tipos de lesiones. Por una parte las lesiones de bajo grado (*low grade*), que incluyen las alteraciones celulares por infección de VPH y las displasias leves (CIN-1); y por otra parte las lesiones de alto grado (*high grade*) que incluyen las displasias moderadas y grave (CIN-2, CIN-3), y el carcinoma *in situ*. Las lesiones de bajo grado en su mayor parte desaparecerán de manera espontánea, incluso sin tratamiento, si bien también es posible su transformación en lesiones de mayor grado. No existen métodos para predecir su evolución. Las lesiones de alto grado se consideran de mayor potencial de transformación maligna, y está justificado su tratamiento a partir de las guías terapéuticas de la Sociedad Americana de Colposcopia

y Patología Cervical. La detección y amplificación del ADN de los VPH de alto riesgo podría usarse de manera complementaria a la citología en casos de duda (23,24).

El carcinoma *in situ* es claramente un precursor del carcinoma infiltrante. Esta conclusión se sustenta en los siguientes hallazgos: 1) la presencia de focos de carcinoma *in situ* y de carcinoma infiltrante coexistentes de forma frecuente en enfermas con tumores de cérvix, 2) el desarrollo de un carcinoma infiltrante hasta en el 70% de las mujeres no tratadas y seguidas durante un mínimo de 12 años tras el diagnóstico de carcinoma *in situ*, y 3) el hecho de que la mayoría de los carcinomas infiltrantes de cérvix se originan a partir de focos de displasia o carcinoma *in situ*. Sin embargo, la velocidad de progresión no es en absoluto uniforme y en general, es difícil si no imposible, predecir la evolución en cada tumor.

La incidencia máxima de los carcinomas invasivos de cérvix está en la quinta década, la de los carcinoma *in situ* en la cuarta década, y la de las lesiones displásicas en mujeres jóvenes entre 20 y 30 años. Durante esta larga evolución no suelen aparecer síntomas o son inespecíficos (sangrado postcoital, flujo vaginal). En caso de afectación extensa pélvica hay dolor pélvico o ciático, edema de miembros inferiores e hidronefrosis. La *American Cancer Society* y el *American College of Obstetrics and Gynecology* recomiendan que en toda mujer con una vida sexual activa y mayor de 18 años se realice un examen pélvico y una citología anual. Tras 3 o más revisiones normales, la frecuencia de la citología podrá ser menor, por ejemplo cada 3 años (25). El estudio citológico sólo detecta la existencia de un posible cáncer de cérvix y es necesaria una biopsia adecuada para el diagnóstico histológico de certeza.

El carcinoma de cérvix localmente avanzado se extiende por contigüidad directa y afecta a las estructuras adyacentes como la vejiga, los uréteres, el recto, la vagina y los ganglios linfáticos pélvicos y posteriormente paraaórticos. No es frecuente al diagnóstico inicial, encontrar una diseminación hematógena a distancia, aunque pueden detectarse metástasis pulmonares, óseas o hepáticas durante el curso de la enfermedad.

Tabla 1. INFORME CITOLÓGICO. Sistema Bethesda modificado, 2001

Valoración de la muestra

Satisfactoria	No datos clínicos
Insatisfactoria	Error en identificación
Muestra rechazada / no procesada	Artefacto
Muestra procesada y examinada	Hipocelularidad
	Citolisis
	Inflamación
	Fondo hemático
	Ausencia células endocervicales

INTERPRETACIÓN/ RESULTADO

Valoración funcional

Compatible con edad e historia. No compatible con edad e historia. No valorable.

Negativo para lesión intraepitelial o malignidad

Infección:

Trichomonas vaginalis
Hongos (consistentes con *Candida sp*)
Cambios en flora sugestivos de vaginosis bacteriana
Bacterias consistentes con *Actinomyces sp*
Cambios celulares sugestivos de virus del Herpes simple
Otros

Cambios celulares reactivos asociados con:

Inflamación (incluye reparación típica)
Atrofia (“vaginitis atrófica”)
Radioterapia
DIU
Células glandulares (posthisterectomía)
Otros

Anomalías de la célula epitelial

Células escamosas:

Células escamosas atípicas de significado indeterminado
no se pueden excluir lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado
Lesión escamosa intraepitelial de bajo grado abarcando: infección por virus papilomavirus humano, displasia leve (CIN-1)
Lesión escamosa intraepitelial de alto grado abarcando: displasia moderada y severa (CIN-2, CIN-3), y carcinoma *in situ*
Sugestivo de carcinoma de células escamosas

Células glandulares:

Células glandulares atípicas (endocervicales, endometriales, sin especificar, células endometriales en mujeres > 40 años)
Sugestivo de adenocarcinoma

ESTUDIO DE EXTENSIÓN. ESTADIAJE

Tras una biopsia positiva para carcinoma invasivo de cérvix, debemos realizar un estudio de extensión que nos permita conocer el estadio de la enfermedad como factor pronóstico y planificar el tratamiento más adecuado. La clasificación actual de la FIGO (tabla 2) (26) es eminentemente clínica y no tiene en cuenta la afectación ganglionar ni el volumen tumoral, que pueden tener una importancia muchas veces sustancial en el manejo. Se recomienda realizar una exploración general y ginecológica, una tomografía axial computerizada (TAC) abdomino-pélvica y una radiografía de tórax. La cistoscopia y/o rectosigmoidoscopia se realizarán si hay síntomas o signos de sospecha de afectación de estas vísceras, en cualquier caso de tumor bulky (> 4 cm) y en pacientes con estadios clínicos IIB o superior. La gammagrafía ósea está indicada sólo si hay sospecha clínica de afectación ósea. La realización de una urografía intravenosa se puede sustituir por el TAC abdomino-pélvico que aporta información no sólo de la presencia de ureterohidronefrosis, sino también del volumen tumoral y de la posible diseminación a ganglios pélvicos o paraaórticos, siendo además de inestimable valor en el diseño y aplicación tanto de la radioterapia externa como de la radioterapia endocavitaria. La resonancia magnética nuclear es incluso superior a la TAC para conocer la penetración del tumor en la profundidad del estroma, la afectación del cuerpo uterino, la afectación parametrial y la relación del tumor con órganos vecinos como vejiga y recto.

La existencia de ganglios paraaórticos afectados por el tumor ensombrece el pronóstico de las pacientes. No hay un procedimiento diagnóstico no invasivo que sea seguro en la valoración de los ganglios paraaórticos. El estudio GOG-63, en enfermas con estadios IIB, III y IVA, exploró la fiabilidad de la linfografía, la TAC y la ecografía en el diagnóstico de los ganglios paraaórticos, y demostró que la exploración más fiable era la linfografía, con sólo un 6% de falsos negativos en el estadio IIB (27).

La fiabilidad de la RNM en el diagnóstico de la afectación paraaórtica ha sido estudiada por Ebner, encontrando una sensibilidad del 55% y una especificidad del 71% (28).

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una técnica de imagen diagnóstica funcional, metabólica o bioquímica, y no puramente anatómica. Se está evaluando su utilidad en la estadificación del cáncer de cérvix, y sobre todo de la afectación ganglionar pélvica y paraaórtica (29,30).

La determinación del antígeno de células escamosas (SCC) en suero es útil en el diagnóstico de la enfermedad avanzada, pero también como factor pronóstico en enfermedad precoz (31-36), en la monitorización de la respuesta al tratamiento y en el seguimiento evolutivo de las enfermas (37).

Tabla 2. Estadios FIGO, 1994

Estadio I: Carcinoma cervical limitado al cérvix.

IA: Carcinoma invasivo pre-clínico, sólo diagnosticado microscópicamente.

Toda lesión diagnosticada macroscópicamente incluso con invasión superficial es un IB

- IA1 Invasión del estroma no mayor a 3 mm de profundidad y de 7 mm o menos de crecimiento horizontal.

- IA2 Invasión del estroma mayor de 3 mm pero menos de 5 mm de profundidad y de 7 mm o menos de crecimiento horizontal.

Nota : La profundidad de la invasión de un tumor se define como la profundidad medida desde la unión epitelio-estromal hasta el lugar más profundo de la invasión. La invasión del espacio vascular venosa o linfática no afecta la clasificación.

IB: Lesión confinada al cérvix clínicamente visible, o lesión microscópica mayor que IA.

- IB1 Lesión clínicamente visible de 4 cm o menos de dimensión máxima.

- IB2 Lesión clínicamente visible de más de 4 cm de dimensión máxima.

Estadio II: Carcinoma de cérvix que invade más allá del útero, pero no la pared pélvica ni el tercio inferior de la vagina.

IIA: Sin invasión del parametrio

IIB: Con extensión del parametrio.

Estadio III: Carcinoma de cérvix que se extiende a la pared pélvica y/o tercio inferior de la vagina y/o produce hidronefrosis o riñón no funcionante.

IIIA: Tumor que afecta el tercio inferior de la vagina, sin extensión a la pared pélvica.

IIIB: Tumor que se extiende a la pared pélvica y/o causa hidronefrosis o riñón no funcionante.

Estadio IV: Tumor que se encuentra fuera de la pelvis con infiltración de la mucosa de la vejiga o recto (IVA) o metástasis a distancia (IVB). La presencia de edema “bulloso” no constituye por si sólo un criterio para clasificarlo como estadio IV.

TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE CÉRVIX

Tratamiento de la enfermedad local avanzada.

La radioterapia radical era considerada el tratamiento primordial de las enfermas con cáncer avanzado de cérvix. Desgraciadamente el fracaso loco-regional de la enfermedad dentro del campo de la radioterapia se produce en más del 40% de las enfermas, especialmente en los estadios localmente o regionalmente avanzados (IIB-IVA) y en estadios precoces (IB-IIA) con lesión bulky o ganglios linfáticos afectos (38). La capacidad de la radioterapia de curar el cáncer de cérvix invasivo está limitada por el tamaño tumoral, de tal forma que la dosis necesaria excedería el límite de toxicidad aceptado para los tejidos sanos adyacentes. Con el fin de disminuir la alta tasa de recidivas pélvicas existen multitud de ensayos clínicos que han utilizado la asociación de quimioterapia bien de forma neoadyuvante o concurrente con la radioterapia para intentar mejorar el control local del tumor y tratar las micrometástasis que pudieran situarse fuera del campo de irradiación.

Los ensayos randomizados que han utilizado quimioterapia neoadyuvante asociada a radioterapia frente a radioterapia como brazo control (39-43) no han demostrado beneficio alguno en términos de supervivencia libre de enfermedad o supervivencia global del brazo de quimioterapia neoadyuvante, e incluso en uno de ellos, realizado por el *Cervical Cancer Study Group of the Asian Oceanian Clinical Oncology Association* (39), el de mayor número de pacientes, se demostró lo contrario; había más recidivas pélvicas y menor supervivencia en el grupo de enfermas tratadas con quimioterapia neoadyuvante que en el brazo control de radioterapia exclusiva. Potish y Twiggs (44) analizaron los resultados de 3 estudios randomizados de quimioterapia neoadyuvante y radioterapia que utilizaban esquemas con cisplatino asociado a otras drogas y concluyeron que la quimioterapia neoadyuvante podría tener un efecto deletéreo en la supervivencia, que explican por la disminución en el control local de la enfermedad, por el retraso en el inicio de la radioterapia, por la baja tasa de respuestas completas y por un aumento de la repoblación celular tumoral que se produce durante la radioterapia.

De entre los ensayos clínicos randomizados anteriores a 1999, que exploraron la utilización de quimioterapia y radioterapia concurrentes frente a radioterapia exclusiva (45,46), sólo el del Gynecologic Oncology Group (GOG) (45) demostró que en el grupo de enfermas que se trataron con hidroxiurea concurrente con radioterapia, la supervivencia libre de enfermedad y global fueron mejores ($p=0.05$ y $p=0.66$, respectivamente), que el grupo de radioterapia exclusiva. Sin embargo este estudio fue muy criticado por el abultado número de enfermas que una vez randomizadas fueron excluidas del mismo.

Existen múltiples estudios fase I/II (47-51) que han investigado la utilización de quimioterapia concurrente con radioterapia existiendo disparidad de resultados, en cuanto a la toxicidad y respuestas al tratamiento. Khoury (50) ensayó la utilización de 5-fluorouracilo y mitomicina C, necesitando reducir la dosis de ambos fármacos por toxicidad. Tras un seguimiento medio de 16 meses no encontró diferencias en la supervivencia de las enfermas tratadas con quimioterapia y radioterapia frente a la de un grupo de enfermas de características similares tratadas con radioterapia exclusiva en la misma institución. Stehman (49) en un ensayo del GOG con 5-fluorouracilo en

infusión continua, hidroxyurea y cisplatino (n=75) objetivó una tasa de respuestas clínicas, parciales o completas del 93.3%, pero en 41 pacientes (54.7%) la toxicidad aguda fue grado 3/4 lo que provocó retrasos en la duración de la radioterapia de más de 1 semana; en estas enfermas tratadas con cisplatino y 5-fluorouracilo en infusión continua se observó una alta tasa de complicaciones tardías grado 4, 23% (4/39) y una muerte tóxica, sin demostrar beneficio en la supervivencia. Souhami (52) investigó el uso de cisplatino semanal 30 mg/m² asociado a radioterapia externa y a braquiterapia de alta tasa de dosis. Tras un seguimiento medio de 27 meses, obtuvo una alta tasa de respuestas clínicas completas 88% (44/50) y aunque la toxicidad aguda fue tolerable (solo 5 casos grado 3), no precisando interrumpir la administración del tratamiento radioterápico, sin embargo la toxicidad crónica gastrointestinal fue grave (grado 3/4) y ocurrió en 13 (26%) pacientes, siendo necesaria la intervención quirúrgica en 7; el alto número de complicaciones graves se achacó al empleo de braquiterapia de alta tasa de dosis con quimioterapia concurrente. De hecho, en la actualidad, la Sociedad Americana de Braquiterapia no recomienda, como tratamiento estándar, la asociación de quimioterapia y braquiterapia de alta tasa de dosis de forma concurrente.

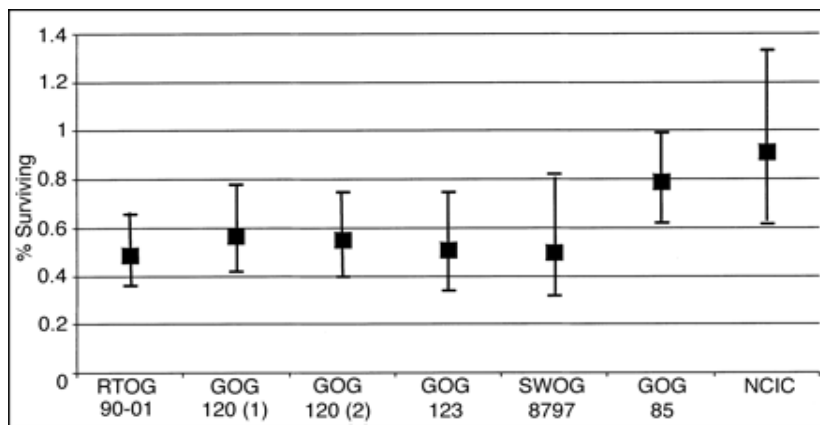
El mayor problema del tratamiento radioterápico asociado a quimioterapia, bien neoadyuvante o concurrente, es el posible aumento de la toxicidad aguda lo que provocaría retrasos y una prolongación del tiempo global del tratamiento, y permitiría la repoblación celular tumoral. El efecto de la prolongación del tratamiento radioterápico ha sido ampliamente estudiado en el carcinoma de cérvix (53-55), habiéndose demostrado su efecto deletéreo en el control pélvico de la enfermedad y en la supervivencia.

En 1999 se comunicaron los resultados de varios trabajos que habían explorado el uso de la quimioterapia concurrente con la radioterapia externa y braquiterapia de baja tasa de dosis (tabla 3); la quimioterapia usada fue cisplatino asociado o no a esquemas con 5-fluorouracilo, y/o hidroxiurea. Los resultados de los trabajos del GOG (56-59) publicados por Rose, Witney, Keys, Peters y el realizado en la RTOG de Morris (60), fueron concluyentes en la necesidad de realizar un tratamiento combinado de radioquimioterapia concurrente con un esquema de quimioterapia basado en cisplatino; por otra parte, aunque esta todavía por dilucidar, parece que la mejor forma de administración del cisplatino sería semanal. Sólo existe un trabajo randomizado que no demostró beneficio estadísticamente significativo, en la asociación de quimioterapia y radioterapia concurrentes, con un esquema de cisplatino, que fue el realizado en el NCI canadiense (61). Este estudio (enfermas con estadios IB-IIA bulky o estadios III-IVA), utilizó cisplatino semanal, y la supervivencia global a 5 años de las enfermas tratadas con cisplatino y RT fue del 66% frente al 56% de las enfermas tratadas con RT exclusiva.

Las razones para la eficacia de la combinación de cisplatino y radioterapia concurrente podrían ser las siguientes (44,62,63): 1) cisplatino produciría una inhibición de la reparación del daño subletal de la cadena de ADN producida por la radioterapia, 2) sensibilizando las células hipóxicas al efecto de la irradiación, 3) reducción de la fracción de células hipóxicas, 4) promueve el paso de células en fase de reposo a fase proliferativa, 5) produce un aumento de la fracción de muerte celular, por el empleo de dos tratamientos, que además no alargan el inicio ni la duración de la radioterapia.

Generalmente, en la combinación de quimioterapia concurrente con radioterapia, cuando se quiere maximizar el efecto radiosensibilizante, sabemos que no son tan importantes los niveles plasmáticos absolutos de las mismas, sino más bien, la duración de las concentraciones efectivas de fármaco dentro del tejido tumoral; el efecto radiosensibilizante es óptimo cuando el fármaco está presente, en una cantidad mínima efectiva en el tejido tumoral, durante todo el tiempo que dura la radioterapia. Estudios *in vitro* con cultivos celulares de tumores humanos en los que se investigaba la fracción de supervivencia celular ante su exposición a radioterapia exclusiva, radioterapia y 5-FU de forma pulsada, o a radioterapia y 5-FU de forma continua durante todo el proceso de irradiación, han mostrado que en esta última forma de exposición, se producía el mayor efecto radiosensibilizante (64,65).

Tabla 3 Ensayos clínicos con quimioradioterapia concurrente



Tratamiento de la enfermedad recurrente o metastática.

La mayoría de las pacientes con enfermedad metastática o recurrente tras quimioradioterapia concurrente deberían ser valoradas para un tratamiento paliativo con quimioterapia. El cisplatino es considerado el fármaco más activo en el tratamiento del cáncer de cérvix (66). Un estudio randomizado del Gynecologic Oncology Group (GOG) (67) comparó la dosis de 50 mg/m² frente a 100 mg/m², cada tres semanas. La tasa de respuestas fue significativamente mayor en el grupo de altas dosis (31% v 21%) pero no hubo diferencias significativas en la tasa de respuestas completas (13% v 10%), en el intervalo libre de progresión ni en la supervivencia global.

En las últimas dos décadas se han desarrollado varias combinaciones de poliquimioterapia basadas en combinaciones con cisplatino. La mayoría de ellas han sido estudiadas en ensayos fase II y algunas han tenido respuestas muy superiores a cisplatino en monoterapia como los esquemas cisplatino/bleomicina/ifosfamida, cisplatino/bleomicina/vinblastina o cisplatino/bleomicina/ciclofosfamida/adriamicina, pero esta superioridad no se reflejó en la duración de la respuesta o en la supervivencia (68).

Existen ensayos fase III que han comparado la poliquimioterapia frente a cisplatino. Un estudio de la EORTC (69) demostró como la combinación de bleomicina/vindesina/mitomicina/cisplatino producía una mayor tasa de respuestas a cambio de una mayor toxicidad, sin un beneficio en la supervivencia libre de progresión ni en la supervivencia global. Por su parte el estudio del GOG (70), también demostraba una superioridad de la combinación de cisplatino e ifosfamida frente al cisplatino tanto en la tasa de respuestas, como por primera vez en la supervivencia libre de progresión. En cambio, la supervivencia global fue similar y las toxicidades hematológicas, gastrointestinales y neurológicas fueron significativamente mayores. En un segundo estudio del GOG (71), la combinación de cisplatino y paclitaxel tenía una mayor tasa de respuestas globales que cisplatino (36.2% v 19.4%), y un aumento en la supervivencia libre de progresión (4.8 meses v 2.8 meses). Sin embargo, de nuevo no hubo un impacto en la supervivencia global. El grupo de pacientes de cisplatino y paclitaxel tuvieron mayor toxicidad hematológica grado 3-4 reversible, sin detectarse diferencias en otras toxicidades. El aumento de la tasa de respuestas y de la supervivencia libre de progresión demostrado en estos dos estudios justificaría el recomendar un regimen de poliquimioterapia, principalmente con cisplatino-paclitaxel por su mejor tolerancia frente a cisplatino-ifosfamida, como alternativa a la monoterapia, siempre y cuando la paciente sea adecuadamente informada acerca de la mayor toxicidad. Recientemente se han publicado los resultados del estudio fase III del GOG 179 en pacientes con cáncer de cérvix metastásico o recurrente que demuestra por primera vez una ventaja modesta aunque significativa en la supervivencia global de la combinación cisplatino más topotecan frente a cisplatino como agente único (9.4 meses vs 6.5).

FACTORES PRONÓSTICOS EN EL CARCINOMA DE CÉRVIX

1. ESTADIO TUMORAL. El estadio tumoral al diagnóstico es el principal factor pronóstico en cuanto a la aparición de recidivas pélvicas y a la supervivencia a largo plazo (tabla 4). Se correlaciona con el tamaño del tumor, el riesgo de afectación ganglionar pélvico y paraaórtico, y con la posibilidad de diseminación metastática. Sin embargo, la clasificación del estadio tumoral según la FIGO no contempla los resultados obtenidos en pruebas diagnósticas del estudio de extensión del tumor como la TAC, RNM o linfografía que pueden proporcionarnos una información sustancial sobre el diagnóstico y la planificación del tratamiento más adecuado.

Tabla 4. Supervivencia global a 5 años del cáncer de cérvix según los diferentes estadios de la FIGO (72).

Estadio	Supervivencia a 5 años (%)
I	80 %
II	60 %
III	30 %
IV	5 %

2. TAMAÑO TUMORAL. Desde 1960 la FIGO ha modificado seis veces el sistema de estadiaje. En su última clasificación (Montreal, 1994) incorporó el criterio del tamaño tumoral con el cual se define mejor el pronóstico del carcinoma de cérvix. Los estudios encuentran una correlación entre el tamaño del tumor, una menor supervivencia y una peor respuesta a la radioterapia, si bien no hay un límite establecido (3, 4 ó 6 cm) a partir del cual el pronóstico cambie de manera radical (73,74).

Burghardt (75) analizó en pacientes tratadas con cirugía, como el volumen del tumor determinado por RNM era mejor indicador pronóstico que el estadiaje de la FIGO. Los tumores con un volumen menor de 2.5 cm³ tenían una supervivencia a 5 años del 91%, en comparación con el 48% para tumores de más de 50 cm³.

Grimard (76) describió como las pacientes con tumores con estadios IB y extensión al endometrio tratadas con cirugía o radioterapia, tenían un incremento de metástasis a distancia y una menor supervivencia. Los tumores con estadios IIB y afectación bilateral de parametrios también tenían peor supervivencia que cuando la afectación era unilateral.

3. AFECTACIÓN DE GANGLIOS LINFÁTICOS. La afectación de ganglios linfáticos pélvicos o paraaórticos del tumor disminuye la supervivencia de las pacientes, aunque no está contemplada en la clasificación de la FIGO. Los ganglios linfáticos paraaórticos son a menudo la primera estación en la diseminación extrapélvica de la enfermedad, y su invasión tumoral confiere un especial mal pronóstico al carcinoma de cérvix localmente avanzado (73). Tanaka (77) comprobó como la supervivencia a 5 años de las pacientes tratadas con cirugía, era diferente en función de la afectación ganglionar, así en las pacientes con afectación ganglionar paraaórtica, era del 10%, de un 49% cuando

la afectación ganglionar era pélvica, y de un 92% cuando no había afectación ganglionar. Además, el número de ganglios pélvicos afectados repercutía en la supervivencia de las pacientes, describiendo las siguientes supervivencias a 5 años en función del número de ganglios afectados: 62% si sólo existía 1 ganglio positivo, 36% si dos, 20% para 3-4 positivos y 0% si 5 o más ganglios positivos.

4. INVASIÓN EN PROFUNDIDAD DEL ESTROMA. Es un factor pronóstico muy importante que se contempla en la clasificación de la FIGO actual. Una invasión del estroma mayor de 10 mm o de más del 70% del estroma se asocia a un peor pronóstico (78), mientras que una intensa respuesta inflamatoria en el estroma del cérvix predice una mejor evolución futura (79).

5. INVASIÓN VASCULAR (*capillary-lymphatic space invasion*). La invasión vascular del tumor, tanto de los vasos linfáticos como sanguíneos, confiere un mal pronóstico a las enfermas y es importante su conocimiento para la toma de decisiones terapéuticas. Los estudios publicados indican que dicha invasión se correlaciona con el grado de penetración del tumor en el estroma del cérvix y con la infiltración ganglionar. Sin embargo, cuando conocemos estos dos factores, la invasión vascular carece de valor pronóstico independiente (73). En pacientes con estadios IA1 y presencia de invasión vascular, la realización de una conización de la lesión podría ser un tratamiento insuficiente, y se podría valorar en estos casos la indicación de una histerectomía con exéresis de los ganglios pélvicos o bien a una radioterapia pélvica si la paciente no es candidata a cirugía (80).

6. TIPO HISTOLÓGICO. En estadios iniciales (al menos IB) de adenocarcinomas y carcinomas adenoescamosos, tratados con cirugía o radioterapia, la tasa de curación es menor y presentan mayor porcentaje de metástasis en comparación con los carcinomas escamosos de cérvix, si bien las tasas de control pélvico son similares. En un meta-análisis en el que se analizaron 1767 pacientes con carcinomas de cérvix estadios IB, tratadas con radioterapia, se comunicó una correlación entre el tipo histológico y la supervivencia. En el análisis multivariante el riesgo relativo de muerte para las 106 (5.9%) pacientes con adenocarcinomas de 4 o más cm de diámetro fue 1.9 veces mayor que para los carcinomas escamosos ($p < 0.01$) (81). También tienen peor pronóstico el carcinoma de células vidriosas, el carcinoma adenoide quístico y por supuesto, el carcinoma de células pequeñas (indiferenciado) que es el más agresivo. El carcinoma verrucoso tiene muy buen pronóstico (73).

7. GRADO DE DIFERENCIACIÓN. No hay ningún estudio que demuestre una relación entre el grado de diferenciación del tumor y la evolución del carcinoma escamoso. Posiblemente esta falta de asociación es debida a la subjetividad para interpretar el grado de diferenciación, a la escasez de la muestra obtenida en determinadas biopsias, y a que los sistemas de clasificación no son adecuados. Sólo hay estudios que demuestran un cierto valor pronóstico entre el grado de diferenciación y el adenocarcinoma de cérvix (82-86).

8. NIVEL DE HEMOGLOBINA. La anemia ha demostrado ser un factor pronóstico desfavorable en los resultados del tratamiento de enfermas con cáncer de cérvix localmente avanzado y de otras neoplasias (87,88). Un estudio canadiense multicéntrico y retrospectivo incluyó entre 1989 y 1992 a 605 mujeres con carcinoma de cérvix estadios IB-IVA tratadas con radioterapia. Analizó la relación entre el nivel de hemoglobina antes y durante el tratamiento radioterápico como factor pronóstico de respuesta al tratamiento. Con un seguimiento medio de 41 meses, el nivel de Hb durante la radioterapia resultó ser un factor pronóstico muy significativo en el análisis multivariable. La supervivencia a los 5 años para pacientes con Hb superior o igual a 12 g/dl fue del 74%, del 52% para Hb entre 11-11.9 g/dl, y del 45% para Hb inferior a 11g/dl ($p < 0.0001$). Había una significativa reducción de las recidivas locales y de las recaídas a distancia en pacientes con Hb igual o superior a 12 g/dl. La aplicación de transfusiones de sangre durante la radioterapia revertía el efecto negativo de la anemia no presentando diferencias con las pacientes que espontáneamente tenían niveles de Hb > 12 g/dl (89). Estos resultados fueron confirmados por otro estudio austriaco pero con un punto de corte para la anemia diferente del anterior ($Hb < 11$ g/dl) (90).

En nuestras pacientes ($n = 105$) con carcinoma de cérvix localmente avanzados tratadas con quimioradioterapia concurrente, hemos estudiado como la presencia de niveles bajos de hemoglobina (< 10 g/dl versus $10-12$ g/dl versus > 12 g/dl) al diagnóstico, se correlaciona significativamente con estadios más avanzados e hidronefrosis, un peor estado general de las enfermas, una menor respuesta inmediata del tumor al tratamiento y una menor supervivencia libre de enfermedad (91).

La interacción entre la anemia del paciente y la hipoxia del tumor está aún pobremente definida, si bien es conocido como la hipoxia influye en el desarrollo de fenotipos tumorales más agresivos, con una mayor capacidad de angiogénesis, proliferación, invasión y formación de metástasis, y con una peor respuesta a los tratamientos quimioterápicos y radioterápicos (92).

Nuevos estudios randomizados y prospectivos son necesarios para confirmar si existe esta asociación entre los niveles de Hb al inicio y sobre todo durante y al finalizar la quimioradioterapia concurrente. Sería de gran interés investigar si esta diferencia pronóstica pudiera ser revertida a partir de la administración de transfusiones de hematíes o de eritropoyetina que mejorarían los niveles de hemoglobina durante el tratamiento.

9. ANTÍGENO DE CÉLULAS ESCAMOSAS (SCC). Las concentraciones séricas de SCC se han correlacionado con el estadio de la FIGO, tamaño del tumor y la afectación ganglionar metastásica en el carcinoma de cérvix de células escamosas (31-35). Un valor elevado de SCC después del tratamiento del cáncer de cérvix se asocia a recurrencia o persistencia de la enfermedad (37). Sin embargo, los resultados acerca del valor pronóstico de SCC en cuanto a la supervivencia son inciertos.

10. EDAD y ESTADO GENERAL. Las pacientes más jóvenes presentan una menor probabilidad de respuesta a la quimioterapia, por lo que se ha postulado que en este grupo de edad se encontrarían los tumores más agresivos con una menor respuesta a la

quimioterapia. Por otro lado, las pacientes con mal estado general, ECOG ≥ 2 , tienen también menor probabilidad de respuesta (93,94).

11. Existen otros posibles factores pronósticos clínicos o biológicos en el cáncer de cérvix. Entre ellos se encuentran los relacionados con la angiogénesis tumoral (95,96), la presencia de trombocitosis (97,98), grado de ploidia tumoral y fracción de células tumorales en fase S del ciclo celular (99), la presencia de DNA de VPH detectado por técnicas de PCR en ganglios linfáticos locoregionales libres de tumor (100,101), expresión de glicoproteína CD44 y sus isoformas, enzima proteolítica metaloproteasa 9, proteína p53, y expresión de receptores de factores de crecimiento (EGFR, *c-erbB-2*). Sin embargo, los resultados son contradictorios en muchos casos. Esto puede ser debido a defectos metodológicos en los estudios de estos nuevos factores, como el análisis retrospectivo de muestras heterogéneas en cuanto a los estadios del tumor y diversidad de tratamientos administrados, escaso número de pacientes, y falta en algunos casos de métodos de medición estándares de laboratorio.

3. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO EN TUMORES SÓLIDOS

El receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR / ErbB-1 /Her-1) es una glicoproteína transductora de membrana de 170 kDa con actividad tirosina kinasa, codificada por un protooncogén localizado en el brazo corto del cromosoma 7p12 (102). Esta proteína pertenece a la familia de los receptores EGF (*Epidermal Growth Factor*) de los que existen identificados 4 miembros: ErbB-1 o Her-1 (EGFR propiamente), ErbB-2 (Her-2/neu), ErbB-3 (Her-3) y el ErbB-4 (Her-4) (103). Estos receptores de la familia EGFR están íntimamente relacionados entre sí. La estructura proteínica de los miembros de esta familia del EGFR consiste en un dominio extracelular que se une a un ligando (excepto para Her-2 que no se ha identificado ningún ligando natural), otro transmembranoso, y un dominio intracelular de tirosina kinasa.

La unión de sus ligandos a EGFR, principalmente el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de transformación alfa ($TGF\alpha$), al dominio extracelular causa la activación por fosforilación de un número de vías de transducción intracelulares que comprometen a *ras/raf-1/mitogen-activated protein kinase*, la *phosphatidylinositol-3-kinase* y *phospholipase C*. Esta cascada de señales produce la transcripción de genes responsables de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular (104).

EGFR interviene en la patogenia de los tumores sólidos mediante 1) la amplificación del gen EGFR no mutado que causa una sobreexpresión del receptor, 2) la expresión del gen EGFR mutado con alteraciones estructurales del receptor que son constitutivamente activas en ausencia de ligando, 3) la hipersecreción autocrina de ligandos (EGF, $TGF-\alpha$) a los que responden con un mecanismo de retroalimentación positiva denominado “loop autocrino”, y 4) la activación de EGFR mediante la formación de heterodímeros en lugar de homodímeros en presencia de otros receptores de factores de crecimiento epidérmico, fundamentalmente *c-erbB2*, que aumentan la duración e intensidad de las señales mitogénicas y la progresión tumoral. A través de estos mecanismos, la vía del EGFR participa en el control del ciclo celular, de la apoptosis, de la angiogénesis, y de la capacidad de invasión y metástasis (105).

El método idóneo para la determinación de este receptor no ha sido claramente establecido, aunque las técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y de radioinmunoanálisis han demostrado que su sobreexpresión se correlaciona con una peor evolución clínica. Se han cuantificado los niveles séricos del dominio extracelular de EGFR en diferentes tumores pero su utilidad clínica es controvertida.

La expresión del EGFR en diferentes tumores (colorectal, próstata, cabeza-cuello, pulmón no microcítico, renal, vejiga, glioma, páncreas, mama, esófago, cervix) y/o de sus ligandos (EGF, $TGF\alpha$) se ha correlacionado con una disminución en el intervalo libre de enfermedad, un estadio tumoral avanzado, un incremento del riesgo de metástasis, y una menor supervivencia global, si bien también hay resultados contradictorios (106). La activación de EGFR mediante la formación de heterodímeros con *c-erbB2*, o la coexpresión de EGFR y de sus ligandos pudiera ser incluso más útil que la expresión aislada de EGFR (107).

Se ha estudiado el valor de EGFR para predecir respuesta tumoral a la radioterapia, quimioterapia y/u hormonoterapia. Los tumores que expresan niveles elevados de EGFR tienen un aumento de la resistencia celular a la radioterapia, y a la terapia hormonal, principalmente a tamoxifeno como ocurre en el cáncer de mama. En cuanto a la quimioterapia, diferentes ensayos clínicos han mostrado una menor respuesta a la quimioterapia en tumores EGFR positivos, pero también se ha reportado como tumores EGFR positivos pueden presentar una mayor tasa de respuesta a citostáticos como cisplatino o doxorrubicina (105).

La investigación de nuevos fármacos con un efecto inhibidor sobre la vía del EGFR, junto a quimioterápicos con el cisplatino y/o radioterapia es de enorme interés para incorporar nuevas alternativas terapéuticas. Entre ellos se encuentran anticuerpos monoclonales que bloquean la unión extracelular del ligando al receptor, oligonucleótidos antisentido dirigidos a neutralizar las secuencias de DNA y mRNA sintetizado, y moléculas de pequeño tamaño inhibidoras de la actividad tirosina kinasa en la región intracelular del EGFR. Estas nuevas moléculas poseen mecanismos de acción diferentes, una disminución en la aparición de resistencias cruzadas, y perfiles de toxicidad no solapables a la quimioterapia tradicional (108). La inhibición de la vía de EGFR con inhibidores de la tirosina kinasa y con anticuerpos anti-EGFR han mostrado efectividad en el tratamiento de algunas neoplasias (colon, pulmón, cabeza y cuello) (109). Es importante destacar que no hay una relación directa entre el grado de expresión de EGFR del tumor y la respuesta a estos fármacos (110-112).

4. EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO EN EL CARCINOMA DE CÉRVIX

EGFR se encuentra sobreexpresado en el cáncer de cérvix entre 6-90% de los casos, según los diferentes estudios (113-125). EGFR interviene en la patógenia del cáncer de cérvix mediante la sobreexpresión de la glicoproteína receptora de membrana, de la amplificación del gen y a través de la secreción autocrina de sus ligandos (EGF, TGF- α). No siempre hay una correlación positiva entre la expresión de la glicoproteína y la amplificación del gen (120, 121, 126). La expresión de sus ligandos puede producir un fenómeno de retroalimentación negativa (*down regulation*) a nivel del receptor de membrana EGFR.

Estudios *in vitro* han observado como la presencia del VPH 16 en células inmortalizadas de cérvix aumenta la expresión de EGFR. La expresión de las oncoproteínas E6/E7 del VPH, y de EGFR son significativamente mayores en biopsias de CIN II y III, y de carcinomas invasivos en comparación con biopsias de CIN I o de tejido normal. También se ha estudiado como la proteína E5 de VPH prolonga la activación de señales de transcripción de la vía del EGFR al reducir la degradación del receptor mediante la inhibición de los endosomas celulares (127-129). Estos datos sugieren una probable asociación entre la presencia de estas oncoproteínas del VPH y la expresión de EGFR en el cáncer de cérvix.

Varios estudios clínicos han tratado de aclarar el papel de EGFR en el comportamiento biológico de estos tumores, así como las posibles implicaciones clínicas que de ello pudieran derivarse (tabla 5).

Pfeiffer (113) estudió la expresión de EGFR y de los ligandos EGF y TGF- α , en 52 pacientes con carcinoma de cérvix (41 estadios I y II; 11 III y IV) mediante técnicas de unión con radioligandos en la pieza del tumor. La expresión de EGF y TGF- α se asoció significativamente a una mayor afectación de ganglios linfáticos pélvicos y/o paraaórticos. La presencia de EGFR fue mayor también en tumores con infiltración ganglionar pero no alcanzaba la significación estadística. De las 7 pacientes EGFR positivas (14%), 5 tuvieron recurrencias del tumor y 2 fallecieron de la enfermedad. En las restantes 45 pacientes, solo hubo 2 recaídas locales del tumor.

Estos datos no fueron confirmados por Hayashi (114) en 52 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix. La expresión de la glicoproteína EGFR medida por IHQ no aumentaba el grado de afectación ganglionar, si bien el porcentaje de tumores EGFR positivos fue muy bajo (6%).

Hale (115) evaluó la expresión de la glicoproteína EGFR mediante IHQ en 62 pacientes con carcinoma de cérvix, estadios iniciales IB y IIA, tratadas con histerectomía radical. El 34% de los tumores fueron EGFR positivos (++/+++), y de acuerdo al tipo histológico, el 50% de los carcinomas epidermoides (10 de 20), el 33% de los adenoescamosos (7 de 21), y el 19% de los adenocarcinomas (4 de 21). Con una mediana de seguimiento de 96 meses, hubo una correlación entre la tasa de mortalidad por cáncer y la positividad de EGFR, que sólo fue significativa en los carcinomas adenoescamosos sin afectación ganglionar. Existía una tendencia a una mayor tasa de mortalidad en los carcinomas epidermoides EGFR positivos, pero no era significativa posiblemente debido al tamaño pequeño de la muestra.

Kristensen (116) analizó retrospectivamente el valor pronóstico de la expresión de cathepsina D, y de los protooncogenes *c-erbB-2* y EGFR en 132 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix estadios IB tratadas con histerectomía radical y linfadenectomía pélvica bilateral. 27 pacientes recibieron tratamiento adyuvante (23 con radioterapia pélvica externa, y de ellos 5 con radioquimioterapia concurrente; 4 con quimioterapia adyuvante exclusiva). La expresión de EGFR se midió por IHQ sobre muestras de tejido congelado y fue positiva en 34 carcinomas (25.8%). La supervivencia libre de enfermedad fue más corta para las pacientes EGFR positivas (RR: 2.1; 95% IC: 0.9-4.9; $p=0.07$). También se produjo esta asociación para la cathepsina D, pero no para *c-erbB-2*. En el análisis multivariable, la positividad conjunta de EGFR y cathepsina D fue el segundo factor pronóstico más importante después del tamaño del tumor.

Oka (117) examinó de manera retrospectiva la expresión de la glicoproteína EGFR mediante IHQ en 216 pacientes con carcinomas de cérvix (191 escamosos, y 25 adenocarcinomas). Las pacientes fueron tratadas con radioterapia estándar y seguimiento durante 5 años. El 33% de los carcinomas escamosos y el 16% de los adenocarcinomas eran EGFR positivos. No se encontró asociación entre la expresión positiva de EGFR y el pronóstico de las pacientes (supervivencia a los 5 años 58.7% en EGFR- versus 54.1% en EGFR+, $p=0.548$). Contrariamente a lo esperado, la expresión de EGFR fue mayor en estadios IB/IIA respecto a estadios III. Ello pudiera explicarse por las diferencias entre las biopsias obtenidas y materiales quirúrgicos empleados, y a la utilización de dos anticuerpos diferentes en la determinación de EGFR.

Scambia (118) estudió el valor pronóstico de EGFR mediante IHQ en una serie prospectiva de 90 pacientes con carcinoma de cérvix (45 estadios I, II; 45 III, IV), la mayoría tratadas con quimioterapia de inducción con platino y posteriormente con cirugía radical (72 pacientes) o bien radioterapia radical (18 pacientes). No existió asociación entre niveles de EGFR y la evolución de las pacientes tras una mediana de seguimiento de 44 meses. De nuevo los tumores con estadios avanzados tenían un menor porcentaje de EGFR positivo que los tumores con estadios más precoces (valor medio de 7.8 fmol/mg para estadios I, II, y 4.2 fmol/mg para estadios III, IV, $p=0.0013$).

Hove (119) analizó si la sobreexpresión de *c-erbB-2*, p53, EGFR y la formación de microvasos influía en la evolución de 22 enfermas con cáncer de cérvix IB (11 con recidiva y 11 sin recidiva tras 4 años de seguimiento). Sólo observaron diferencias significativas en la formación de microvasos que fue mayor en las enfermas recidivadas.

Kersemaekers (120) determinó la expresión de EGFR en 136 pacientes con carcinomas de cérvix estadios I y II mediante IHQ. El 54% de los tumores fueron EGFR positivos (73 casos), y presentaron una disminución en la supervivencia libre de enfermedad (54% vs 80%, $p=0.002$) y en la supervivencia global (55% vs 88%, $p=0.003$), con una mediana de seguimiento de 5 años. La expresión de EGFR se correlacionó con factores clínico-patológicos como el estadiaje, el tamaño tumoral y la invasión linfática vascular. No hubo una buena asociación entre la expresión de la glicoproteína EGFR y la amplificación de su gen por Southern blot (solo se produjo en 4 casos de 32). La expresión positiva de EGFR se comportó como un factor pronóstico independiente en estadios precoces de carcinoma de cérvix. Otros oncogenes como *c-erbB-2* no mostraron esta relación.

Ngan (121) evaluó la expresión de las proteínas EGFR y *c-erbB-2* mediante IHQ, y la amplificación de sus oncogenes por técnica de Southern blot en 101 pacientes con carcinoma de cérvix (50 estadios IB, IIA; 51 estadios \geq IIB). El 19.8% y 74.2% presentaron una sobreexpresión de las glicoproteínas *c-erbB-2* y EGFR respectivamente, mientras que la amplificación de los genes por Southern blot fue sólo del 17.2% y 35.4%. La sobreexpresión de las proteínas o la amplificación génica de *c-erbB-2* y EGFR no tuvieron una correlación estadística positiva con la supervivencia global de las pacientes ni una asociación con la detección del VPH, tanto en los estadios iniciales como en los avanzados de la enfermedad.

Min-Jeong (122) analizó los niveles séricos del dominio extracelular (ECD) de EGFR mediante una técnica de enzoinmunoanálisis (ELISA) en 26 pacientes con carcinoma invasivo de cérvix, 12 neoplasias intraepiteliales de cérvix y 38 controles. Se consideró una concentración de 100 fmol/mg de proteína (dos veces la desviación estándar de la media del grupo control) como punto de corte. El valor medio del ECD de EGFR para los carcinomas invasivos de cérvix (165 fmol/ml) fue significativamente más elevado comparado con los controles (66 fmol/ml) y también mayor que en los carcinomas intraepiteliales (126 fmol/ml). Para el autor la sobreexpresión del ECD de EGFR en el suero de las pacientes puede ser un marcador potencial de progresión desde lesiones precancerosas a carcinomas intraepiteliales y posteriormente a carcinomas invasivos de cérvix. Los niveles del ECD de EGFR no se correlacionaron con el tamaño ni con el estadiaje del tumor, lo que podría ser debido al tamaño pequeño de la muestra.

Kim (123) determinó la expresión de la glicoproteína EGFR mediante la técnica de ELISA en 73 pacientes con carcinoma de cérvix (estadio IA, 7; IB, 19; IIA, 8; IIB, 7; III, 29; IV, 3). Los niveles mensurables de EGFR oscilaron ampliamente entre 31 y 2874 fmol/mg, con un valor medio de 582 fmol/mg. A partir de un punto de corte de 250 fmol/mg, el 71% de los tumores fueron EGFR positivos. Con una mediana de seguimiento de 58 meses, los tumores EGFR positivos tuvieron un peor pronóstico en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad y a la supervivencia global. En el análisis multivariable la expresión positiva de EGFR fue factor pronóstico para la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, independiente del tamaño del tumor y del estadio de la FIGO. La mayor expresión de EGFR en carcinomas invasivos de cérvix, principalmente en tumores > 4 cm, respecto a neoplasias intraepiteliales y a casos controles, sugiere un papel de EGFR en favorecer la progresión tumoral del cáncer de cérvix.

Gaffney (124) estudió en 55 pacientes con carcinoma de cérvix (48 escamosos, 5 adenocarcinomas, 2 adenoescamosos) estadios IB-IV, y tratadas con radioterapia externa más braquiterapia, la sobreexpresión de factores de crecimiento como VEGF (vascular endothelial growth factor) y EGFR mediante IHQ. Ambos se asociaron a un peor pronóstico de las enfermas con una menor supervivencia global, para una mediana de seguimiento de 24 meses. La histología de células escamosas tenía una mayor expresión positiva de EGFR que los adenocarcinomas, aunque no se especificaron los porcentajes obtenidos. Del mismo modo comprobó como el aumento de la expresión de *c-erbB-2* era más frecuente en los adenocarcinomas con una mejoría en la supervivencia libre de enfermedad y global de estos tumores, si bien ello pudiera deberse a su mayor expresión en tumores con estadios menos avanzados (125).

En base a estos resultados, EGFR podría intervenir en la patogenia tumoral estimulando la progresión del cáncer de cérvix, desde las lesiones precancerosas hasta las invasivas y dotando de un comportamiento biológico más agresivo a estos tumores. Aún así, el papel pronóstico de la expresión de EGFR en el cáncer de cérvix es aún pobremente comprendido y controvertido. La falta de un método consistente estándar ha producido esta disparidad de resultados del EGFR como factor pronóstico en el cáncer de cérvix y en otras neoplasias. Es importante subrayar como la vía de transducción de EGFR puede estar incrementada no solo a través de la expresión de EGFR en la membrana de las células tumorales, sino por otros mecanismos como la hipersecreción autocrina de ligandos que producen una retroalimentación positiva o la activación de EGFR mediante la formación de heterodímeros con otros receptores de la familia, fundamentalmente *c-erbB-2*.

Tabla 5. Correlación entre la expresión EGFR y el pronóstico en pacientes con cáncer de cérvix.						
Autor	Nºde Casos	Método	Pto corte (fmol/mg)	EGFR+ (%)	Seguimiento (media meses)	Significado clínico
Pfeiffer (1989)	52	RL	100	14	18	Indicador agresividad biológica (¿?)
Hayashi (1991)	52	IH	≥ 1	6	NM	NS
Hale (1993)	62	IH	≥ 2	34	96	Correlación mortalidad en adenoescamosos GL-
Kristensen (1996)	132	IH	≥ 1	25.8	73.9	↓SLE (p= 0.014)
Oka (1997)	216	IH	≥ 1	33	NM	NS
Scambia (1997)	90	RL	6	51	41	NS
Hove (1999)	22	IH	≥ 2	NM	48	NS
Kersemaerker(1999)	136	IH	≥ 1	54	48	↓SG (p=0.04)
Ngan (1999)	101	IH	≥25%	74.2	29	NS
Kim (2002)	73	ELISA	250	71.2	58	↓SG (p=0.005) ↓SLE(p=0.002)
Gaffney (2003)	55	IH	-	-	24	↓SG (p=0.011)

RL: unión radioligando; IH: inmunohistoquímica; ELISA: enzimoimmunoanálisis; SLE: supervivencia libre enfermedad; SG: supervivencia global; NM: no medido; NS: no significación.

5. EXPRESIÓN DE *c-erbB-2* (HER-2) EN TUMORES SÓLIDOS.

El gen Her-2 (*c-erbB-2*, p185) es un protooncogén localizado en el cromosoma 17q23 que codifica una glicoproteína transmembranosa de 185 kDa, que tiene estructura de receptor de factor de crecimiento, con un dominio extracelular y un dominio intracelular con actividad tirosina kinasa (130). *c-erbB-2* tiene un papel central en la familia EGFR, constituyendo potentes heterodímeros, principalmente con Her-1 ó EGFR, con una elevada potencia de transducción de señales mitogénicas (131-132).

De especial interés ha sido el conocimiento del papel de *c-erbB-2* en el cáncer de mama. La amplificación / sobreexpresión de *c-erbB-2* se ha observado en el 20-30% de las pacientes con cáncer de mama, y hasta en el 50% de los carcinomas inflamatorios (133). Los estudios preclínicos y clínicos indican como la amplificación de este gen y la sobreexpresión del receptor tiene una importancia crítica en la transformación oncogénica, la proliferación tumoral y el desarrollo de metástasis de determinados tipos de tumores malignos como el de mama, con una mayor agresividad clínica y un peor pronóstico (134-136). A partir de este comportamiento, el receptor *c-erbB-2* fue estudiado como diana molecular terapéutica específica de tratamientos antineoplásicos del cáncer de mama.

Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG1) dirigido contra el dominio extracelular de la oncoproteína *c-erbB-2*. Ha sido aprobado para su uso como agente único o en combinación con taxanos en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama adyuvante o metastático *c-erbB-2* positivos (137).

Es importante destacar como las pacientes con cáncer de mama *c-erbB-2* positivo pueden responder a ciertos agentes citotóxicos y al tratamiento hormonal de forma distinta a las *c-erbB-2* negativo. Los tumores *c-erbB-2* positivos responden menos al tratamiento hormonal, principalmente al tamoxifeno (138-139), pero otros estudios no han encontrado esta asociación (140). Existe una evidencia creciente que sugiere que las pacientes *c-erbB-2* positivas muestran una respuesta incrementada a una dosis óptima versus dosis subóptima de antraciclinas, mientras esa diferencia no se observa en las *c-erbB-2* negativas (141-144).

Se ha descrito la amplificación de *c-erbB-2* en un pequeño porcentaje de otros tipos de cánceres como el carcinoma epitelial de ovario, endometrio, adenocarcinoma gástrico, páncreas, de vejiga, próstata, no microcítico de pulmón, y de cabeza y cuello. El significado clínico de *c-erbB-2* en estos tumores es menos conocido (145).

La tinción por IHQ, que identifica la expresión de la proteína en células tumorales, es el método más frecuente usado para evaluar el estatus de *c-erbB-2*. Actualmente se ha estandarizado el método Hercep Test® (DAKO). El FISH (fluorescence in situ hybridization) determina la amplificación del gen mediante la hibridación de una sonda de DNA con secuencias complementarias al gen marcadas con fluorescencia. La IHQ es el método de screening recomendado para estudiar la sobreexpresión de la proteína *c-erbB-2* debido a que esta técnica es más barata, menos laboriosa y con una buena concordancia con el FISH en los resultados negativos (0, +1) o en los fuertemente positivos (+3). Sólo en aquellas mujeres positivas intermedias (+2) que puedan beneficiarse de un tratamiento con trastuzumab estaría indicada la cuantificación de la amplificación del gen mediante el FISH.

6. EXPRESIÓN DE *c-erbB-2* EN EL CÁNCER DE CÉRVIX.

La glicoproteína *c-erbB-2* se encuentra sobreexpresada en el cáncer de cérvix entre 12-70%, según los estudios (116,146-157). De nuevo, estas diferencias pueden ser consecuencia de la heterogeneidad de las poblaciones estudiadas en cuanto a la diversidad de estadios, y a las diferentes técnicas usadas tanto en la preparación de las muestras de los tejidos como en la aplicación de distintos anticuerpos en la inmunohistoquímica. Por otro lado si parece existir una buena correlación entre la sobreexpresión de la proteína y la amplificación del gen (150).

Los estudios clínicos publicados muestran datos de una posible relación entre la sobreexpresión de la proteína y estadios más avanzados (151,154), e incluso en algunos de ellos una correlación con un peor pronóstico de la enfermedad (147,154), si bien estos resultados son controvertidos y no permiten establecer conclusiones definitivas. Los siguientes estudios son los más importantes realizados hasta la fecha (tabla 6).

Berchuck (146) estudió el valor pronóstico de la expresión de *c-erbB-2* en 26 pacientes con cáncer escamoso de cérvix estadios I-IV, observando una tinción débil (+1) por IHQ en 25 casos. La única paciente con metástasis a distancia, tuvo una tinción intensa (+3) para *c-erbB-2*. Para el autor, la sobreexpresión de *c-erbB-2* en estos tumores es poco frecuente si bien pudiera asociarse a un comportamiento biológico más agresivo.

Hale (147) también asoció la sobreexpresión de la proteína *c-erbB-2* por IHQ (38%) a un peor pronóstico en cuanto a una menor supervivencia en 62 pacientes con estadios precoces de cáncer de cérvix, IB y IIA (20 escamosos, 21 adenoescamosos, 21 adenocarcinomas) tratadas con cirugía.

Kuniyuki (148) estudió por IHQ la expresión de *c-erbB-2* en 192 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix estadio III, tratadas con radioterapia. Las 37 (19%) pacientes *c-erbB-2* positivas tuvieron un peor pronóstico con una tasa de supervivencia a 5 años significativamente inferior a las *c-erbB-2* negativas (61% v 41%; $p=0.022$).

Mandai (149) analizó la expresión de la proteína *c-erbB-2* en 88 enfermas con carcinoma de cérvix estadios I y II (39 adenocarcinomas, 39 escamosos, 8 adenoescamosos, 2 indiferenciados). *c-erbB-2* fue positivo en el 49% de adenocarcinomas y en el 38% de escamosos, y se asoció con una mayor afectación ganglionar y un peor pronóstico en los adenocarcinomas de cérvix, pero no en los tumores escamosos.

De igual modo, Kihana (150) en 44 pacientes con adenocarcinomas de cérvix, asoció la expresión de *c-erbB-2* (25%) con estadios tumorales más avanzados, y una peor supervivencia independiente de la afectación ganglionar y grado del tumor. La mayoría de los tumores positivos mostraron una amplificación del gen *c-erbB-2*.

Costa (151) examinó por IHQ la expresión de *c-erbB-2* en 82 pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix con diferenciación glandular (41 adenocarcinomas, 41 adenoescamosos) estadios I-IV, tratadas con cirugía (+/- quimioterapia) y/o radioterapia. El 54.9% de las muestras fueron positivas, lo cual se correlacionó con la presencia de estadios III y IV. También ocurrió una mayor

proporción de recidivas a los 24 meses, si bien esta relación no se mantuvo en el tiempo.

Kristensen (116) halló un 12% de expresión positiva para *c-erbB-2* determinada por IHQ, en 132 pacientes con carcinoma de cérvix estadio IB. La expresión de *c-erbB-2* no influyó en la supervivencia libre de enfermedad.

Wong (152) determinó la amplificación del gen *c-erbB-2* mediante técnica de PCR en 70 mujeres chinas con carcinoma escamoso de cérvix, estadios I (29), II (37) y III (4). La amplificación del gen fue mayor en las pacientes fallecidas por la enfermedad respecto a las que permanecieron vivas (43% v 12%), si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.062$), probablemente por el tamaño de la muestra.

Ndubisi (153) estudió la expresión de *c-erbB-2* por IHQ en 150 pacientes con carcinoma de cérvix, estadios I-IV. El 22% de las biopsias fueron positivas. Las pacientes *erbB-2* positivas tuvieron una supervivencia global ligeramente inferior a las negativas (51% v 56%), pero no fue significativa. No se encontró una correlación entre el protooncogen y los factores clínico-patológicos como el estadio, grado del tumor o tipo histológico.

Nakano (154) evaluó la expresión de *c-erbB-2* por IHQ en 54 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix (estadios: I, 2; II, 13; III, 42; IV, 7), tratadas con radioterapia. El 42% de las enfermas fueron *c-erbB-2* positivas, aumentando significativamente en los estadios más avanzados. De igual modo las pacientes *c-erbB-2* tuvieron una menor supervivencia a los 5 años de seguimiento (45.1% v 75.6%, $p<.01$), debido sobre todo a una mayor tasa de recaídas locales, lo que sugirió que las células tumorales que expresan *c-erbB-2* pudieran ser más radioresistentes.

Nevin (155) examinó por IHQ la expresión de *c-erbB-2* en 126 pacientes con carcinoma de cérvix estadios iniciales IB/IIA (70 escamosos, 37 adenoescamosos, 19 adenocarcinomas) tratadas con histerectomía radical y linfadenectomía pélvica bilateral. *c-erbB-2* fue expresado en 48 enfermas (38.1%) y se comportó como un factor pronóstico desfavorable independiente en la disminución de la supervivencia, junto con la infiltración tumoral de los parametrios y la afectación de ganglios linfáticos pélvicos.

Heller (156) estudió mediante IHQ con Hercep Test® de DAKO, la expresión de *c-erbB-2* en 24 pacientes con carcinoma escamoso de cérvix (IB-IIIB). Solo 4 (15.75%) casos mostraron una tinción positiva +2, y no hubo ninguna tinción +3. *c-erbB-2* positivo fue más frecuente en los tumores con afectación del margen vaginal, pero no se asoció con el estadio, grado de diferenciación o afectación linfática.

Niibe (157) evaluó la expresión de *c-erbB-2* (43%) por IHQ en 21 pacientes con carcinoma escamoso de cervix estadio IIIC por afectación ganglionar paraaórtica. Las pacientes fueron tratadas con radioterapia externa pélvica con extensión a paraaórticas más braquiterapia. La supervivencia a 5 años fue del 28% para las enfermas *c-erbB-2* positivas frente al 52% de las negativas, siendo un factor pronóstico independiente en el análisis multivariable.

Tabla 6. Correlación entre la expresión c-erbB-2 y el pronóstico en pacientes con cáncer de cérvix.						
Autor	Nºde Casos	Método	Pto corte (fmol/mg)	c-erbB-2 (%)	Seguimiento (media meses)	Significado clínico
Berchuck (1990)	26	IH	+3	3.8%	-	Baja frecuencia agresividad biológica \downarrow
Hale (1992)	62	IH	+3	38.7%	-	\downarrow SG (p< 0.0001)
Kuniyuki (1993)	192	IH	≥ 1	19%	60	\downarrow SG (p< 0.022)
Mandai (1994)	88	IH	≥ 1	38% escamosos 49% edenocarcinomas	NM	\uparrow N+ peor pronóstico solo en adenocarcinomas
Kihana (1994)	44	IH	+3	25%	60	estadios más avanzados \downarrow SG (p<0 .005)
Costa (1995)	82	IH	$\geq 50\%$	54.9%	-	estadios más avanzados \uparrow recurrencias a 24 meses
Wong (1996)	70	PCR gen amplificado		16%	22	\downarrow SG (p 0.062)
Ndubisi (1997)	150	IH	+3	22%	60	NS
Nakano (1997)	54	IH	≥ 1	42%	60	\downarrow SG (p <0.001) \uparrow recurrencias locales
Nevin (1999)	126	IH	NM	38%	60	\downarrow SG (p <0.028)
Heller (2003)	24	IH	≥ 2	15.7% (+2)	NM	NS
Niibe (2003)	21	IH	NM	43%	NM	\downarrow SG (p <0.024)

IH: inmunohistoquímica; PCR: reacción en cadena polimerasa; SLE: supervivencia libre enfermedad; SG: supervivencia global; NM: no medido; NS: no significación.

7. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: La quimio-radioterapia concurrente ha representado un gran avance en el tratamiento de las enfermas con cáncer de cérvix, consiguiendo mejorar los resultados en términos de supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG). Sin embargo, alrededor del 50% de las enfermas con tumores localmente avanzados de cérvix morirán por progresión de la enfermedad. Creemos que la coexpresión de los receptores de membrana de la familia del receptor de crecimiento epidérmico, EGFR y *c-erbB-2*, podría explicar, al menos en parte, ésta peor evolución clínica y ser útiles factores pronósticos en nuestras enfermas. A partir de ésta hipótesis nos proponemos los siguientes objetivos de estudio:

Objetivo primario: Determinar el impacto que tiene la coexpresión de los receptores EGFR y *c-erbB-2*, en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia libre de fracaso pélvico (SLFP).

Objetivos secundarios:

- 1) Describir los niveles de coexpresión de EGFR y *c-erbB-2* en las biopsias.
- 2) Correlacionar la coexpresión de EGFR y *c-erbB-2*, con los factores pronósticos clásicos estudiados como: la edad, el estado general (según escala EGOG), el tamaño tumoral, el estadio FIGO, la presencia de ganglios positivos en CT y la utilización de quimioterapia con cisplatino.
- 3) Analizar el patrón de recaída en función de la sobreexpresión de EGFR, de *c-erbB-2*, y de la coexpresión de ambos receptores.
- 4) Evaluar la influencia de los factores pronósticos clásicos en la SLE y SLFP.
- 5) A la vista de los resultados obtenidos, intentar proponer nuevos enfoques terapéuticos dirigidos específicamente contra EGFR y/o *c-erbB-2*, en pacientes con cáncer de cérvix local avanzado, en combinación con la quimioradioterapia concurrente con cisplatino.

8. MATERIAL Y MÉTODO

POBLACIÓN ESTUDIADA

Este trabajo de investigación, se ha efectuado en el Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario Doce de Octubre de Madrid. Desde diciembre de 1994 hasta enero de 2007, hemos tratado 192 pacientes diagnosticadas de carcinoma avanzado de cérvix, estadios IB-IVA, no operados. Para la realización del presente trabajo, hemos seleccionado 170 pacientes en las que pudimos realizar, de forma prospectiva, las determinaciones de EGFR y *c-erbB-2*. La evolución de las pacientes fue ciega para el patólogo.

La evaluación inicial del tumor se realizó mediante examen pélvico, colposcopia con toma de biopsia y TAC abdomino-pélvico. Todas las enfermas presentaban ECOG ≤ 3 , buena función hepática, plaquetas $>100.000 \text{ mm}^3$, neutrófilos $>2000 \text{ mm}^3$, no se requirió ningún valor mínimo de hemoglobina. La cifra de creatinina debía ser inferior a 2 mg/dl.

TRATAMIENTO RADIOTERÁPICO

Primera fase:

Se administró radioterapia pélvica en 100 casos (59%) (dosimetría 3D, 4 campos conformados isocéntricos y fotones de Rayos X de 18 o 25 MV, procedentes de acelerador lineal). La dosis al PTV fue de 46-50 Gy con fraccionamiento clásico (5x200 cGy). En 70 casos (41%) se administró radioterapia pélvica y paraórtica (igual forma de administración que antes). La dosis al PTV fue de 45 Gy con un fraccionamiento de 5x180 cGy.

Segunda fase:

Cuando se pudo se realizó braquiterapia, en una sola aplicación, entre 1 y 10 días de la finalización de la radioterapia externa (Colpostato utilizado: Delouche®, o molde personalizado de Chassagne; Isótopo: Cs 137 LDR, aparato: Curietron®). En 107 (63%) casos la sobreimpresión se realizó con braquiterapia exclusiva, en 30 (18%) casos con braquiterapia y sobreimpresión parametrial con fotones de Rayos X de 18 o 25 MV (campos AP-PA, con bloque conformado de cerrobend (cerrobend blocks) que cubría la isodosis 15 Gy de la radioterapia endocavitaria), dosis administrada: 60-70 Gy.

La dosis media administrada con braquiterapia al punto A, fue de 26 Gy (mediana =28, p25=19, p75=31, r: 15-45). El volumen medio de la isodosis 60 Gy (ICRU 38) fue de 290 cc (mediana 293, p25= 210, p75= 336; r: 80-789) (158). La prescripción de dosis al punto A, usualmente, estuvo limitada por la dosis media recibida en recto y/o vejiga (no mas de 65-70 Gy entre radioterapia externa y endocavitaria).

En 33 (19%) pacientes, no se realizó braquiterapia, realizándose la sobreimpresión con radioterapia externa (dosimetría 3D, 4 campos reducidos conformados isocéntricos y fotones de Rayos X de 18 o 25 MV); Dosis total acumulada al PTV 65-70 Gy a fraccionamiento clásico (5x180 o 5x200 cGy). La no realización de braquiterapia en estas enfermas, se debió en 12 ocasiones a rechazo por la enferma, en 11 por edad avanzada y/o mal estado general y en 10 por mala geometría del implante o imposibilidad técnica para realizarlo.

TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO

Entre diciembre de 1994 y febrero de 1999, se trataron 52 enfermas (31%) con tegafur (Utefos®), 800 mg/día por vía oral, en 2 tomas, durante todo el tratamiento radioterápico y hasta 3 meses después de su finalización. Tras la alerta clínica del NCI en febrero de 1999 (159), modificamos el esquema de quimioterapia tratándose entre marzo de 1999 y enero de 2007 a 114 pacientes (67%) con un esquema de cisplatino, 40 mg/m² iv/ semanal durante la radioterapia externa (en 51 pacientes además se administró Tegafur con el mismo esquema descrito anteriormente). En 80 de 114 (70%) pacientes se administró un último ciclo de cisplatino durante la administración de la radioterapia endocavitaria. El número medio de ciclos de CDDP administrados fue de 5.8 (mediana= 6, rango: 1-8). La dosis total media de cisplatino administrada, por paciente fue de 370 mg. (mediana: 320, p25 = 287, p75 = 370, rango: 67-497). Hubo 4 pacientes (2%) que recibieron tratamiento radioterápico radical sin quimioterapia asociada, un primer caso debido a una insuficiencia renal crónica severa, el segundo una insuficiencia cardíaca congestiva y antecedente de ictus isquémico, el tercero una hepatopatía crónica por VHC con descompensaciones hidrópicas y una cuarta paciente con una leucoencefalopatía en el seno de una serología HIV positiva.

SEGUIMIENTO DE LAS PACIENTES

El seguimiento de las pacientes se realizó cada 3 meses durante los 2 primeros años, cada 6 meses durante los 3 años siguientes y una vez al año a partir del 5 año. En cada visita se realizó un examen físico general, una exploración ginecológica, analítica, evaluación de la toxicidad tardía de todos los procedimientos empleados. Rx de torax y TAC de abdomen y pelvis cada 6 meses los cinco primeros años y posteriormente 1 vez al año. El seguimiento de las pacientes en este estudio finalizó en enero de 2007, no habiéndose perdido ninguna enferma.

ANÁLISIS MOLECULARES

Las biopsias sobre bloques de parafina dónde habían muestras tumorales suficientes fueron seleccionadas para un posterior análisis molecular a partir de técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). La realización de tales técnicas y su posterior lectura e interpretación fue realizada por el mismo patólogo (Dr Claudio Ballestín, Hospital Universitario 12 Octubre). Aquellos casos dónde no había material suficiente fueron descartados para el estudio posterior.

Determinación del EGFR y *c-erbB-2*:

- Todas las biopsias fueron fijadas en formol tamponado e incluidas en parafina.
- De los bloques obtenidos se cortó una sección que se tiñó con Hematoxilia-Eosina para diagnóstico y además se realizaron otros cortes para estudio inmunohistoquímico que se montaron en portas silanizados para mejorar la adherencia. Los cortes fueron de 3 micras de grosor. Los portas se dejaron a 37° C una noche.
- Posteriormente se realizó una desparafinización y aplicación de las técnicas de IHQ.
- El anticuerpo usado para marcar la proteína *c-erbB-2* fue un anticuerpo anti-*c-erbB-2* policlonal de conejo (Dako; Glostrup. Denmark) a 1/300 y con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Para EGFR se se utilizó un anticuerpo monoclonal clone H11 (Dako, M-3363), a 1/100 y con un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se empleó un inmunoteñidor automático Tech Mate 500 (Dako; Glostrup. Denmark) usando un sistema estreptoavidina-biotina-peroxidasa optimizado para el teñidor automático (LSAB de Dako) (160,161). El cromógeno empleado fue diaminobencidina con contratinción con Hematoxilina.
- En los controles se utilizó para *c-erbB-2* un adenocarcinoma mamario positivo y para EGFR se usó epidermis.
- Valoración EGFR: para su clasificación se siguió un procedimiento estandarizado semicuantitativo, valorándose la tinción membranosa y citoplasmática. EGFR se consideró negativo si ninguna de las células lo expresaban; positivo (+), 1-30% de células teñidas; positivo (++), 31-69% de células teñidas; positivo (+++), > 69% de células teñidas.
- Valoración *c-erbB-2*: solo se valoraron las tinciones membranas, de forma semicuantitativa: (-) ninguna de las células se teñían; (+) tinción del 1% al 30% (++); del 31% al 69%; y (+++) > 69%.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos contamos con la colaboración de la Unidad de Epidemiología- Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre (Javier de la Cruz y David Lora), tratándose los datos de la siguiente forma:

A. Variables del estudio

1. Variables evento:

Evento 1 (cualquier tipo de fracaso): paciente que ha sido tratada con radioterapia y presenta un fracaso pélvico, retroperitoneal, metastático o mixto.

Evento 2 (fracaso pélvico): paciente que ha sido tratada con radioterapia y presenta un fracaso pélvico.

2. Variables tiempo:

Tiempo 1: tiempo transcurrido desde la finalización del tratamiento radioterápico hasta el fracaso pélvico, retroperitoneal, metastático o mixto. En caso de no suceder el fracaso, tiempo hasta la última revisión o día de fallecimiento.

Tiempo 2: tiempo transcurrido desde la finalización del tratamiento radioterápico hasta el fracaso pélvico. En caso de no suceder el fracaso, tiempo hasta la última revisión o día de fallecimiento.

3. Variables de estratificación:

Hemos elegido como variables de estudio las siguientes: 1) edad menor o igual a 45 años frente a mayor de 45 años; 2) presencia o ausencia de adenopatías pélvicas y/o paraaórticas en CT (tomografía axial computerizada); 3) valoración del estado general de la paciente con la escala ECOG, agrupando las enfermas con puntuación 0-1 frente a las pacientes con puntuación 2-3; 4) tamaño tumoral menor o igual a 6 cm o mayor de 6 cm; 5) estadio FIGO, para el análisis univariante hemos agrupado las enfermas con estadios IB-IIA-IB2 en el grupo 1, los estadios IIB como grupo 2, los estadios IIIB como grupo 3 y los estadios IVA como grupo 4; para el estudio multivariante y debido a que tan sólo tenemos 59 fracasos, hemos agrupado las enfermas en dos grupos: grupo 1 para los estadios IB-IIA-IB-IIB, y grupo 2 para los estadios IIIB-IVA; 6) por último se ha estudiado el efecto del cisplatino en estas enfermas, agrupando a las enfermas según fueran tratadas con o sin cisplatino.

B. Análisis de los datos

1. Estadística descriptiva: se obtiene una descripción general de las distintas variables del análisis. El resumen de la información de las variables tratadas se presenta, para aquellas que son cualitativas o no numéricas, mediante su distribución de frecuencia absoluta y porcentaje. Las variables numéricas o cuantitativas se describieron mediante sus medidas de tendencia central (media, mediana), acompañadas de las medidas de dispersión (desviación estandar, rango intercuartílico).

2. Estadística analítica: Para cada uno de los dos tiempos, tiempo1 y tiempo2, se realizaron los siguientes análisis:

2.1. Análisis univariante:

2.1.1. Tabla de supervivencia:

Describimos el tiempo hasta el evento desarrollando las curvas de supervivencia mediante el método actuarial. Obtenemos la función de probabilidad de supervivencia. Se presentan las probabilidades de supervivencia sucedida a los 3 y 5 años junto con sus intervalos de confianza al 95%.

2.1.2. Tablas de supervivencia estratificadas:

Se valora la relación entre los distintos factores o características de las enfermas y el tiempo hasta el evento estimándose las curvas de supervivencia mediante el método actuarial, presentando en aquellos casos que fue posible la probabilidad de supervivencia sucedida a los 3 y 5 años. La diferencia entre las distribuciones de supervivencia de cada uno de los grupos, en función de un factor o una característica de la enferma se valoran mediante la prueba Log-Rank. Cada uno de los estudios de supervivencia se acompaña de su gráfica correspondiente.

2.1.3. Regresión de riesgos proporcionales de Cox:

En aquellas variables o factores de naturaleza continua se utilizó la técnica de regresión de riesgos proporcionales de Cox siendo la variable considerada como dependiente “tiempo hasta el evento” obteniéndose en cada caso una estimación de la fuerza de asociación (hazard ratio) a cada factor junto con su intervalo de confianza al 95% y su significación estadística.

2.2. Análisis multivariante:

Se completó el estudio con un análisis multivariante, utilizando la técnica de regresión de riesgos proporcionales de Cox siendo la variable considerada como dependiente el tiempo hasta el evento. Para obtener un modelo final en el análisis multivariante se consideró tanto aquellos factores de riesgo con resultado significativo en el univariante como aquellos que tenían cierto interés o relevancia dentro del estudio. Se calculan los hazard ratio asociados para las variables independientes del modelo final, presentándose junto con sus intervalos de confianza al 95%.

9. RESULTADOS

ANÁLISIS DE LAS PACIENTES

Entre diciembre de 1994 y enero de 2007, se estudiaron 170 pacientes diagnosticadas de carcinoma localmente avanzado de cérvix estadios IB-IVA, no operadas, tratadas con 2 esquemas de quimio-radioterapia concurrentes descritos previamente. En todas ellas se analizó *prospectivamente* la expresión de EGFR y c-*erbB*-2 por inmunohistoquímica. Para el estudio estadístico hemos agrupado las biopsias en 135 c-*erbB*-2 -/+ /++ (79%) frente a las 35 c-*erbB*-2 +++ (21%). De la misma manera hemos clasificado las biopsias en 115 EGFR ++ /+++ (68%) frente a 55 EGFR -/+ (32%). En adelante nos referiremos a ellas como biopsias c-*erbB*-2 negativas y positivas, y EGFR negativas y positivas, respectivamente. De ellas 25 (15%) fueron [EGFR y c-*erbB*-2 positivo], 100 (59%) [EGFR o c-*erbB*-2 positivo] y 45 (26%) [EGFR y c-*erbB*-2 negativo]. Las características clínicas de estas pacientes se describen en la tabla 7, así como de los tratamientos administrados en la tabla 8.

Tabla 7. Características clínicas de las pacientes estudiadas (N=170)

	n (%)
<i>Edad</i> (media; años)	55 (rango 30 - 85)
≤45	39 (23)
>45	131 (77)
<i>ECOG</i>	
0	17 (10)
1	124 (73)
2	21 (12)
3	8 (5)
<i>Histología</i>	
Epidermoide	150 (88)
Adenoca + Adenoescamoso	20 (12)
<i>Estadio FIGO</i>	
IB-IIA	21 (12)
IIB	47 (28)
IIIB	82 (48)
IVA	20 (12)
<i>Tamaño tumoral</i>	
≤ 6 cm.	98 (58)
> 6 cm	72 (42)
<i>Ganglios en CT</i>	
Negativos	133 (78)
Pélvicos	20 (12)
Paraaóuticos (+/- pélvicos)	17 (10)
<i>Expresión EGFR</i>	
-	31 (18)
+	24 (14)
++	30 (18)
+++	85 (50)
<i>Expresión c-erbB-2</i>	
-	78 (46)
+	30 (18)
++	27 (15)
+++	35 (21)
<i>Coexpresión receptores</i>	
[EGFR y c-erb-B2 negativo]	45 (26)
[EGFR o c-erb-B2 positivo]	100 (59)
[EGFR y c-erb-B2 positivo]	25 (15)

Tabla 8. Descripción de los tratamientos administrados

Quimioterapia:			Dosis media de cisplatino/paciente
Con cisplatino	114 (67)	<i>320 mg (p25=287, p75=370 mg)</i> <i>nº medio de ciclos 5,8 (r:1-8)</i>	
Sin cisplatino	52 (31)		
No quimioterapia	4 (2)		
Radioterapia externa:			Dosis total
Pélvica	100 (59)	46-50 Gy (5x200 cGy)	
Pélvica y paraórtica	70 (41)	45 Gy (5x180 cGy)	
Boost:			Dosis punto A / Vol. Isodosis 60 Gy
Braquiterapia	107 (63)	26 Gy / 268 cc (r: 15-45 Gy) / (r: 60-575cc)	
Braquiterapia+RT externa	30 (18)		
RT externa exclusiva	33 (19)	65-70 Gy (5x180 o 5x200 cGy)	

- Tabla 9. Nº ciclos de cisplatino durante la radioterapia (114 pacientes). La dosis media de platino se situó en un rango entre 67 mg y 497mg dosis total acumulada.

Nº CICLOS Platino	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
1	1	0.59	57	33.53
3	1	0.59	58	34.12
4	4	2.35	62	36.47
5	22	12.94	84	49.41
6	68	40.00	152	89.41
7	17	10.00	169	99.41
8	1	0.59	170	100.00

Respuesta a la quimio-radioterapia concurrente.

Al finalizar el tratamiento, 131 pacientes (77%) presentaron una respuesta clínica completa de la enfermedad, 34 (20%) estaban en respuesta parcial, 5 (3%) pacientes presentaron estabilización-progresión de la enfermedad.

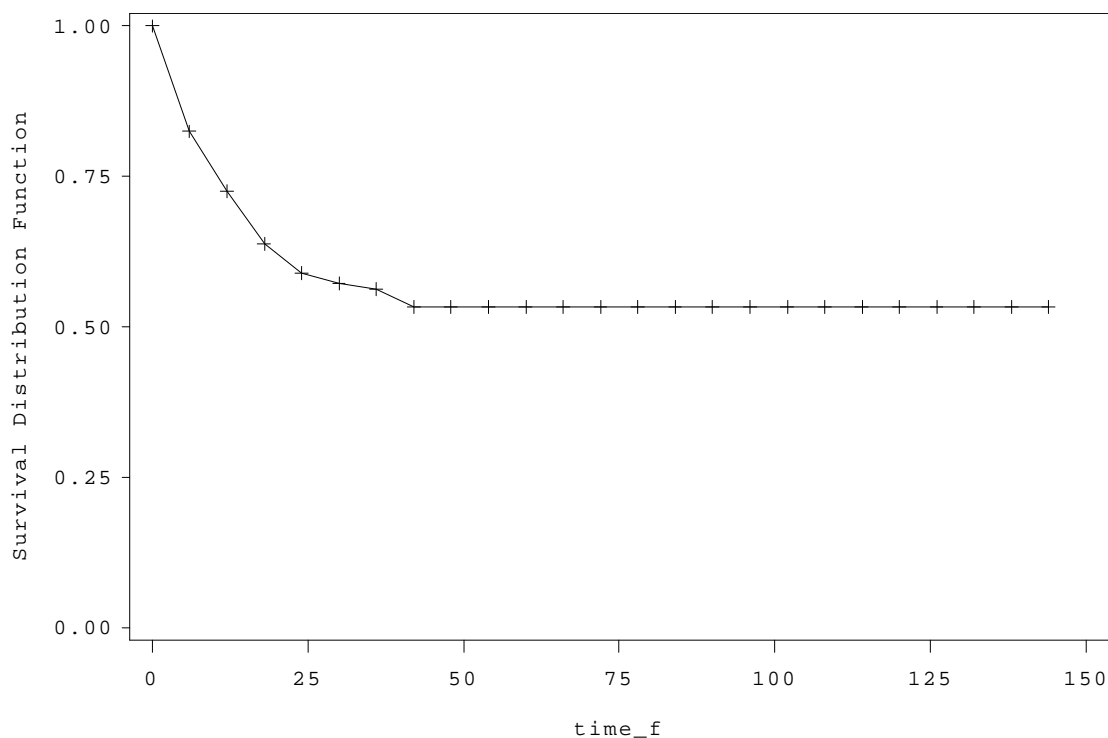
En las pacientes con respuesta parcial se utilizó quimioterapia de forma precoz cuando el marcador tumoral SCC marcaba para enfermedad en ausencia de rash cutáneo o reacción de recall o psoriasis. Estas enfermas fueron tratadas usualmente con carboplatino-paclitaxel x 6 ciclos. Si las enfermas tenían respuesta parcial y el SCC era normal y había marcado al diagnóstico, se esperó a la revisión de los 3 meses para comprobar el estado de la paciente. Las pacientes con persistencia-progresión de la enfermedad fueron tratadas de forma sintomática, debido a su mal estado general.

Se realizó cirugía en 12 pacientes: 2 pacientes en la primera revisión a los 3 meses de la finalización de la radioterapia, en ellas se realizó una histerectomía extrafascial; de ellas una recidivó precozmente y murió por progresión pocos meses después y la otra ha sido operada hace 1 año y aún está libre de enfermedad. En 10 pacientes se intentó rescate quirúrgico entre 6 meses y 24 meses tras la finalización de la radioterapia, usualmente cirugía de exanteración bien anterior o posterior, todas murieron por progresión de la enfermedad, sin intervalo libre sin enfermedad, salvo dos, una de ellas murió a los dos años por progresión de la enfermedad y otra sigue viva tras tres años sin signos de recidiva.

Resultados del seguimiento de las pacientes.

Desde la finalización de la radioterapia, 102 (60%) pacientes no tuvieron ningún tipo de fracaso terapéutico, y 68 (40%) pacientes desarrollaron algún tipo de recaída. En la fecha del último análisis de seguimiento, 98 (58%) pacientes están vivas sin tumor, 4 (2%) vivas con tumor, 61(36%) fallecieron a consecuencia del tumor, 7 (4%) fallecieron sin tumor (1 por quemaduras extensas, 3 por accidentes cerebro vasculares, 2 por infarto agudo de miocardio, 1 por desnutrición secundaria a una depresión mayor con autopsia negativa para tumor). La supervivencia global estimada a 3 y 5 años fue de 56% (CI 95% 47-64) y 55% (CI 95% 46-63). La supervivencia causa específica a 3 y 5 años fue 59% (CI 95% 50-66) y 58% (CI 95% 49-66) respectivamente. La supervivencia libre de enfermedad estimada a 3 y 5 años fue de 56% (CI 95% 47-63) y 53% (CI 95% 44-61) (figura 1).

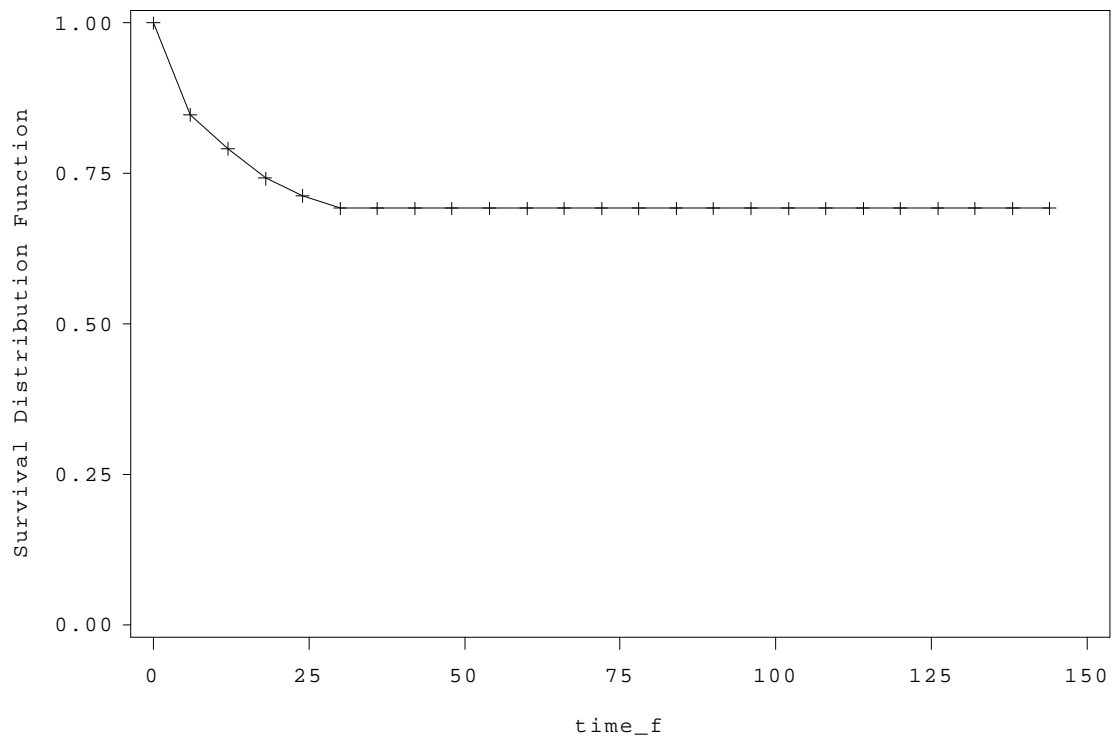
Figura 1. Curva de supervivencia libre de enfermedad de las 170 pacientes



La mediana de SLE de las 102 pacientes sin fracaso fue de 42 meses (rango: 1-144). La mediana de SLE de las 68 pacientes con cualquier tipo de fracaso fue de 6 meses (rango: 0-38).

Desde la finalización de la radioterapia, 44 pacientes (26%) presentaron fracaso pélvico. La supervivencia libre de fracaso pélvico estimada a 3 y 5 años fue de 69 % y 69% (figura 2).

Figura 2. Curva de supervivencia libre de fracaso pélvico de las 170 pacientes



La mediana de SLFP de las 126 pacientes sin fracaso pélvico fue de 32 meses (rango: 1-144). La mediana de SLFP de las 44 pacientes con fracaso pélvico fue de 5 meses (rango: 0-29). Observamos como el patrón temporal de fracaso pélvico es más precoz que el de fracaso a distancia, por dos razones: 1) incluye las enfermas dónde el tumor primario no reponde al tratamiento inicial con persistencia de su enfermedad pélvica, y 2) la recidiva pélvica suele ser más precoz, y usualmente más fácil de diagnosticar mediante biopsia.

Patrón de recaída en función de la sobreexpresión de EGFR y c-erbB-2, y de su coexpresión.

En la tabla 10 se describen los tipos de fracasos asociados o no, que se han producido en nuestras pacientes. Los tipos de recaídas de la enfermedad fueron los siguientes: 37 pélvicas exclusivas; 3 pélvicas y retroperitoneo; 1 pélvico, retroperitoneo y asociada a metástasis a distancia; 3 pélvicas asociadas a metástasis a distancia; 5 retroperitoneales y metástasis a distancia; 8 retroperitoneales puro; 11 metástasis a distancia de forma exclusiva.

Tabla 10. Tipos de fracasos				
C_TFRACA	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
1-pélvico	37	21.76	37	21.76
2-pélvico-retroperitoneal	3	1.76	40	23.53
3-pelvico-retroperitoneal y mts	1	0.59	41	24.12
4- pélvico y mts	3	1.76	44	25.88
5 retroperitoneal y mts	5	2.94	49	28.82
6-retroperitoneal	8	4.71	57	33.53
7-mts	11	6.47	68	40.00
8-sin fracaso	102	60.00	170	100.00

Dos pacientes con recaída ganglionar retroperitoneal, pudieron ser rescatados con radioterapia y quimioterapia concurrentes, sin evidencia de la enfermedad tras un seguimiento de más de 5 años.

Para el estudio del fracaso pélvico hemos considerado aquél que se produce como primera manifestación de fracaso pélvico esté asociado o no a otros tipos de fracasos.

Tabla 11. Tipos fracasos asociados	Frequency	Percent	Cumulative Frequency	Cumulative Percent
1-2-3-4	44	25.88	44	25.88
5-6-7	24	14.12	68	40.00
8	102	60.00	170	100.00

Tipos de fracaso agrupados: 1-2-3-4 cualquier tipo de fracaso pélvico asociado o no a otros, 5-6-7 retroperitoneal y metastásico, 8 sin fracaso

Para EGFR positivo existe un claro aumento de fracaso pélvico estadísticamente significativo frente a EGFR negativo (31% vs 15%, $p = 0.04$).

Table 12 Relación EGFR/ tipo fracaso asociado				
Expresión EGFR	Tipos fracasos asociados			Total
Frequency Row Pct	Pelvic	Retro Dista	No fraca	
EGFR -/+	8	7	40	55
	15	13	73	
EGFR ++/+++	36	17	62	115
	31	15	54	
Total	44	24	102	170

Para *c-erbB-2* positivo existe una clara tendencia a un mayor número de fracasos pélvicos aunque no se alcanzó la significación estadística frente a *c-erbB-2* negativo (40% vs 22%, $p = 0.08$).

Table 13 Relación c-erbB-2/ tipo fracaso asociado				
Expresión c-erbB-2	Tipos fracasos asociados			Total
Frequency Row Pct	Pélvico	Retro Dista	No fraca	
c-erbB-2 -/+ /+++	30	19	86	135
	22	14	64	
c-erbB-2 +++	14	5	16	35
	40	14	46	
Total	44	24	102	170

Para la combinación de ambos, EGFR y *c-erbB-2* positivos, uno u otro positivo frente a ambos negativos, también existe una diferencia estadística significativa para el fracaso pélvico (48%, 26% y 13% respectivamente, $p = 0.008$).

Table 14 Relación EGFR y <i>c-erbB-2</i> con el tipo de fracaso asociado				
Expresión <i>c-erbB-2</i> /EGFR	Tipos fracasos asociados			Total
Frequency Row Pct	Pélvico	Retro Dista	No fraca	
[EGFR y <i>c-erbB-2</i> negativo]	6	4	35	45
	13	9	78	
[EGFR or <i>c-erbB-2</i> positivo]	26	18	56	100
	26	18	56	
[EGFR y <i>c-erbB-2</i> positivo]	12	2	11	25
	48	8.	44	
Total	44	24	102	170

No se produjeron diferencias estadísticamente significativas para el fracaso a distancia en función de la expresión de EGFR, *c-erbB-2* o de la coexpresión de ambos receptores.

Relación entre la coexpresión de EGFR y / o *c-erbB-2* y las variables pronósticas clásicas

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la coexpresión de EGFR y *c-erbB-2*, y la agrupación por estadios tumorales (tabla 15), ni con ninguna de las otras variables clásicas del estudio. 21 pacientes con estadios IB y II (de un total de 68) fueron [EGFR and *c-erbB-2* negative] frente a las 24 pacientes estadios IIIB y IV (de un total de 102) que fueron negativos. 6 pacientes con estadios IB y II fueron [EGFR and *c-erbB-2* positive] frente a 19 con estadios IIIB y IV, p 0.17.

Table 15 Correlación FIGO estadio y expresión EGFR y/o <i>c-erbB-2</i>			
Expresión <i>c-erbB-2</i> /EGFR	FIGO estadio		Total
Frequency Percent	IB,II	IIIB, IV	
[EGFR y <i>c-erbB-2</i> negativo]	21	24	45
	12	14	26
[EGFR or <i>c-erbB-2</i> positivo]	41	59	100
	24	35	59
[EGFR y <i>c-erbB-2</i> positivo]	6	19	25
	4	11	15
Total	68	102	170
	40.00	60.00	100.0

Análisis univariante para supervivencia libre de enfermedad de los factores pronósticos estudiados

En las 170 enfermas se ha evaluado el valor pronóstico de los factores clínicos establecidos en la literatura como son el tamaño tumoral, la edad, ECOG *performance status*, estadio FIGO, afectación de ganglios linfáticos pélvicos y/o paraaórticos por TAC, la administración de quimioterapia concurrente con cisplatino, y la expresión y coexpresión de EGFR y c-*erbB*-2 en la pieza tumoral. La influencia de cada uno de ellos en la SLE de enfermedad a 3 y 5 años en el análisis univariante ha sido la siguiente:

1) Tamaño del tumor

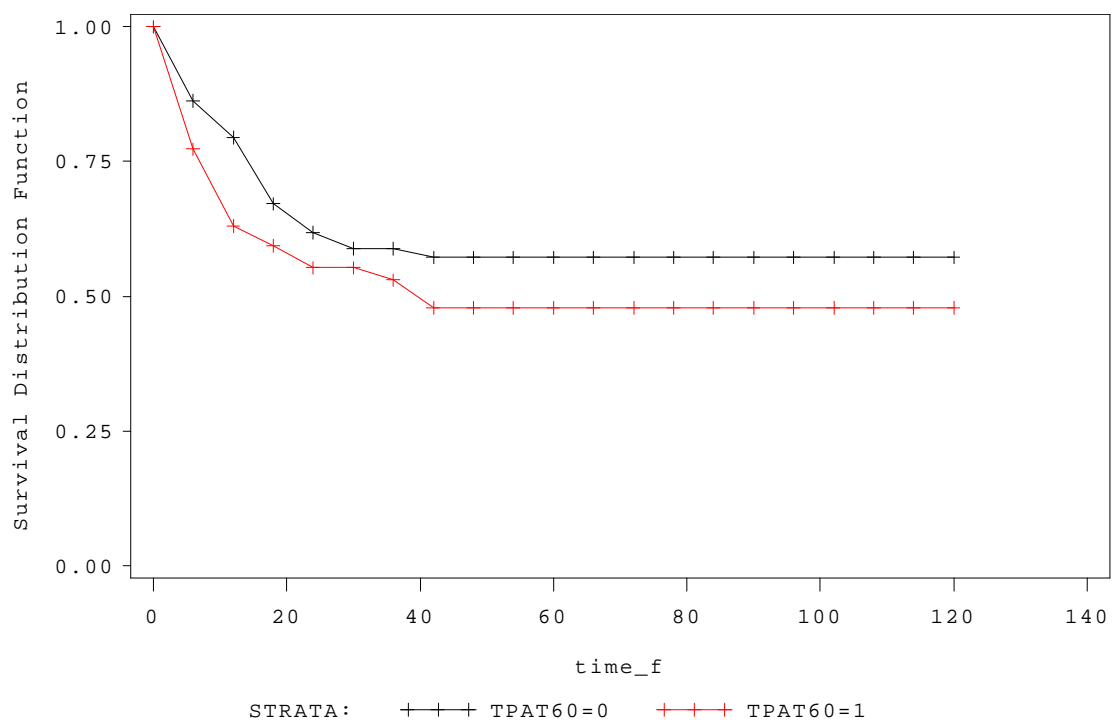
SLE a 3 y 5 años ≤ 6 cm: 59% y 57%

SLE a 3 y 5 años > 6 cm: 53% y 48%, $p=0.17$

Tabla 16. Análisis univariante SLE de tamaño tumoral (≤ 6 o > 6)

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	tamaño	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	≤ 6	98	36	62	63.27
2	> 6	72	32	40	55.56
Total		170	68	102	60.00

Figura 3



2) Edad. La edad media de las pacientes al diagnóstico fue de 55 años (rango: 30-85).

SLE a 3 y 5 años ≤ 45 años: 46% y 36%

SLE a 3 y 5 años > 45 años: 59% y 58%

HR para la edad ≤ 45 años 1.9

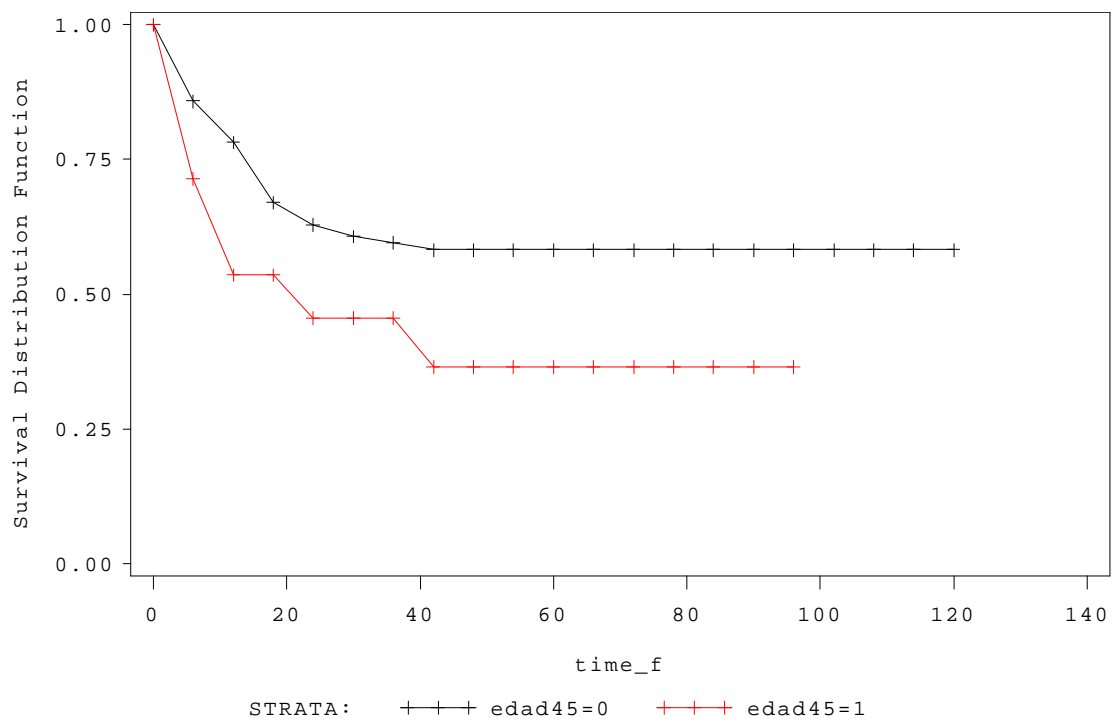
IC 95%: 1.14 – 3.2

p = 0.01

Tabla 17. Análisis univariante SLE de la edad (≤ 45 o > 45)

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	edad45	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	> 45	131	47	84	64.12
2	≤ 45	39	21	18	46.15
Total		170	68	102	60.00

Figura 4



3) Agrupación por ECOG:

ECOG 0-1: 61% y 57%

ECOG 2-3: 32% y 32%

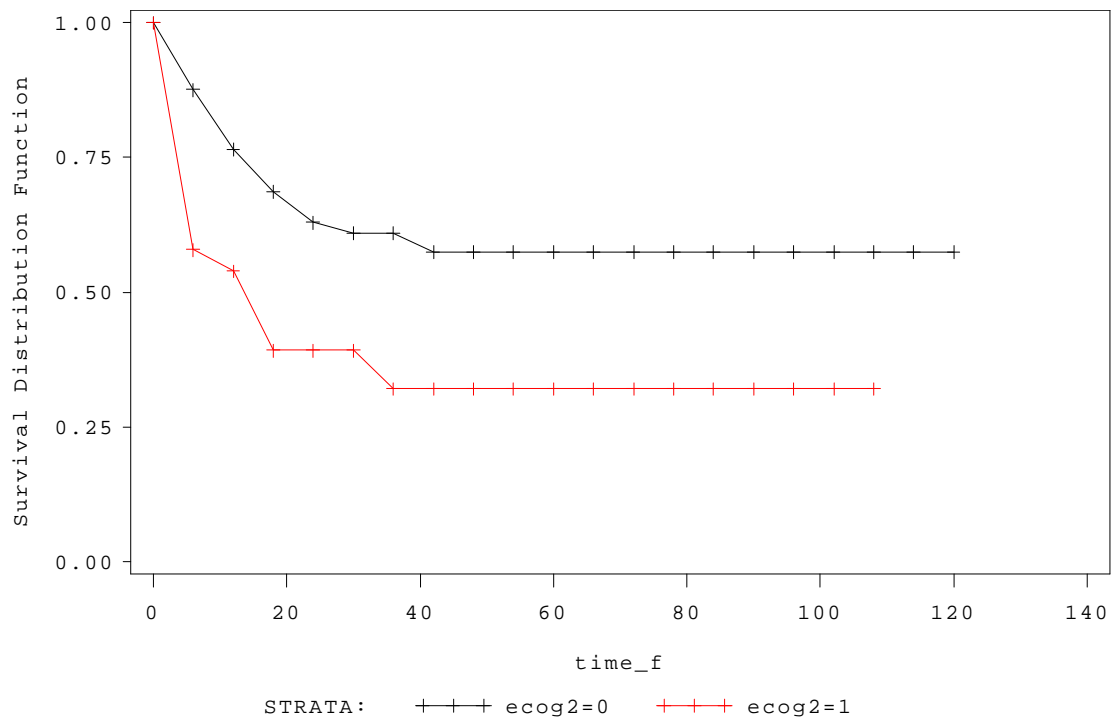
HR para ECOG2-3 2.46

IC 95%: 1.41 – 4.27

P= 0.001

Tabla 18. Análisis univariante SLE de ECOG					
Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	Ecog	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	0/1	141	51	90	63.83
2	2/3	29	17	12	41.38
Total		170	68	102	60.00

Figura 5



4) La agrupación por estadio FIGO:

IB-IIA-IIB: 75% y 69%

IIIB-IVA: 44% y 42%

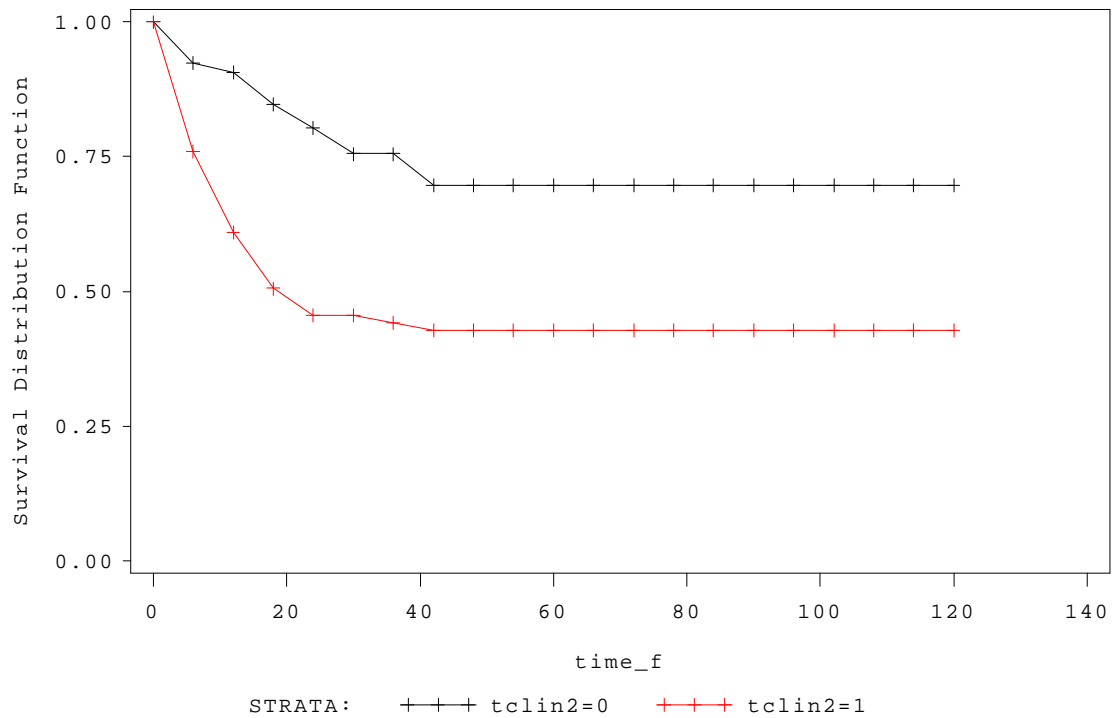
HR para estadios IIIB-IVA frente a IB-IIA-IIB 2.88

IC 95%: 1.62 – 5.12

P = 0.0003

Tabla 19. Análisis univariante SLE por estadio FIGO					
Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	FIGO	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	I-II	68	15	53	77.94
2	III-IV	102	53	49	48.04
Total		170	68	102	60.00

Figura 6



5) Presencia de ganglios por CT:

CTN-: 61% y 57%

CTN+: 31% y 31%

HR para CTN+ 2.12

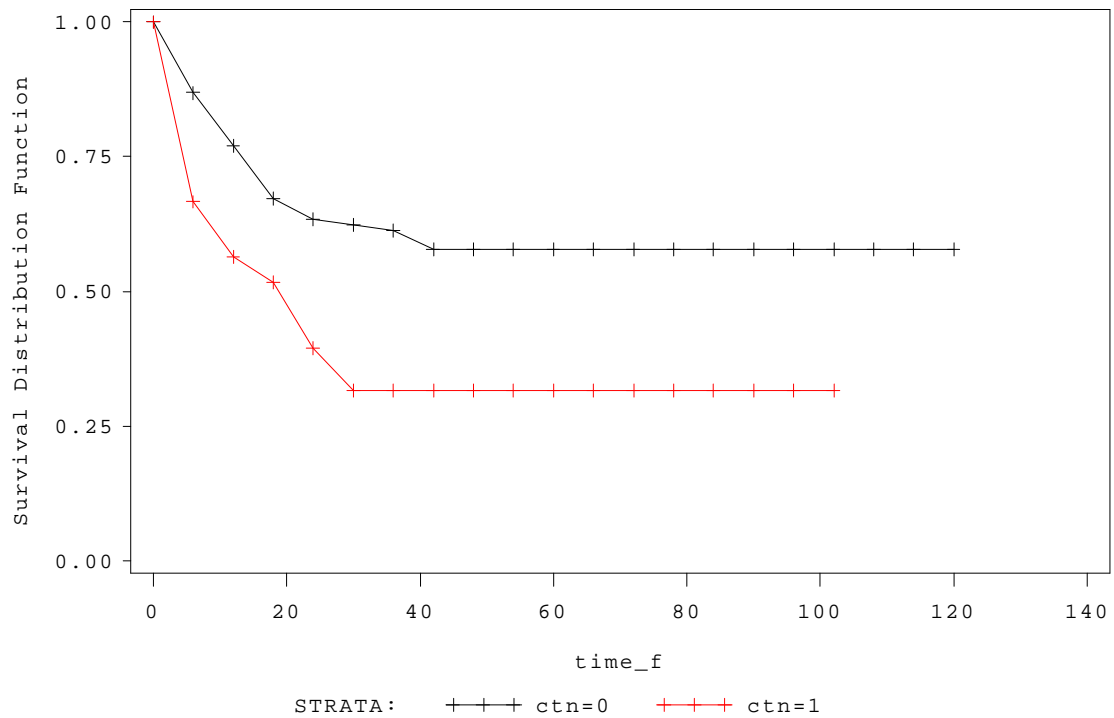
IC 95%: 1.24 – 3.64

p = 0.005

Tabla 20. Análisis univariante SLE de afectación ganglionar por CT

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	CT	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	NO	133	49	84	63.16
2	SI	37	19	18	48.65
Total		170	68	102	60.00

Figura 7



6) Esquema de quimioterapia (166 pacientes):

Sin platino: 46% y 39%

Con platino: 60% y 60%

HR para la quimioterapia con platino 0.59

IC 95%: 0.37 – 0.96

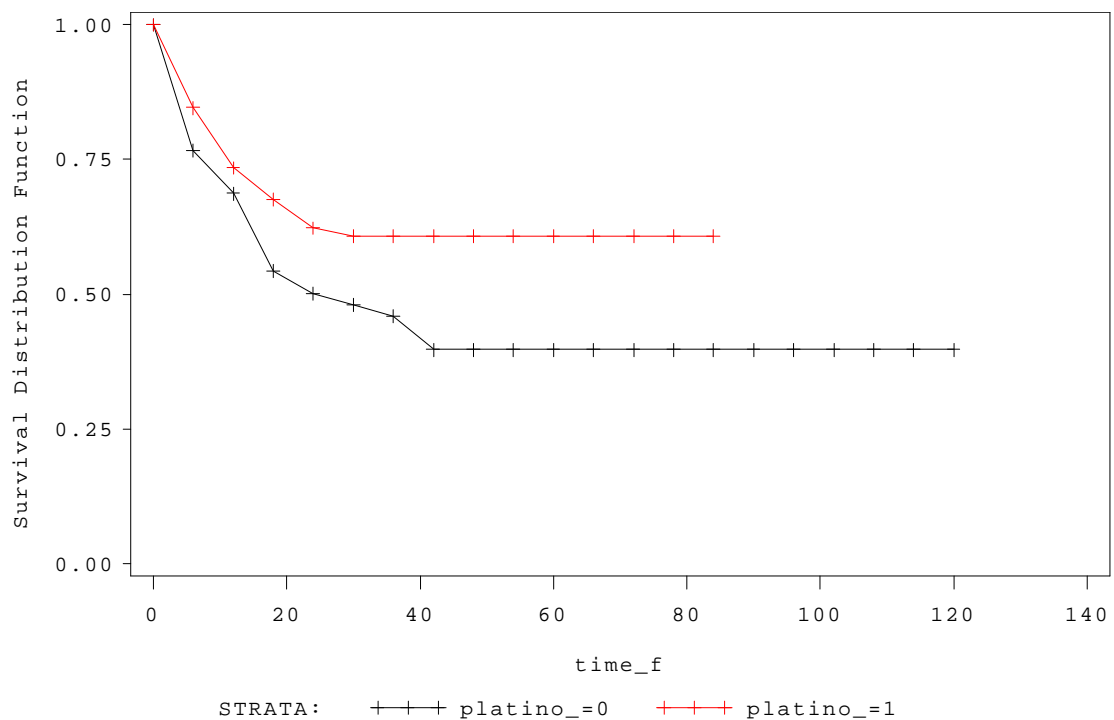
p = 0.03

Tabla 21. Análisis univariante SLE de tratamiento con o sin cisplatino

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	platino_	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	NO	52	30	22	42.31
2	SI	114	38	76	66.67
Total		166*	68	98	59.04

* 4 pts solo RT con intención radical por motivos ya indicados

Figura 8



7) Determinación de EGFR:

EGFR -: 70% y 70%

EGFR +: 71% y 71%

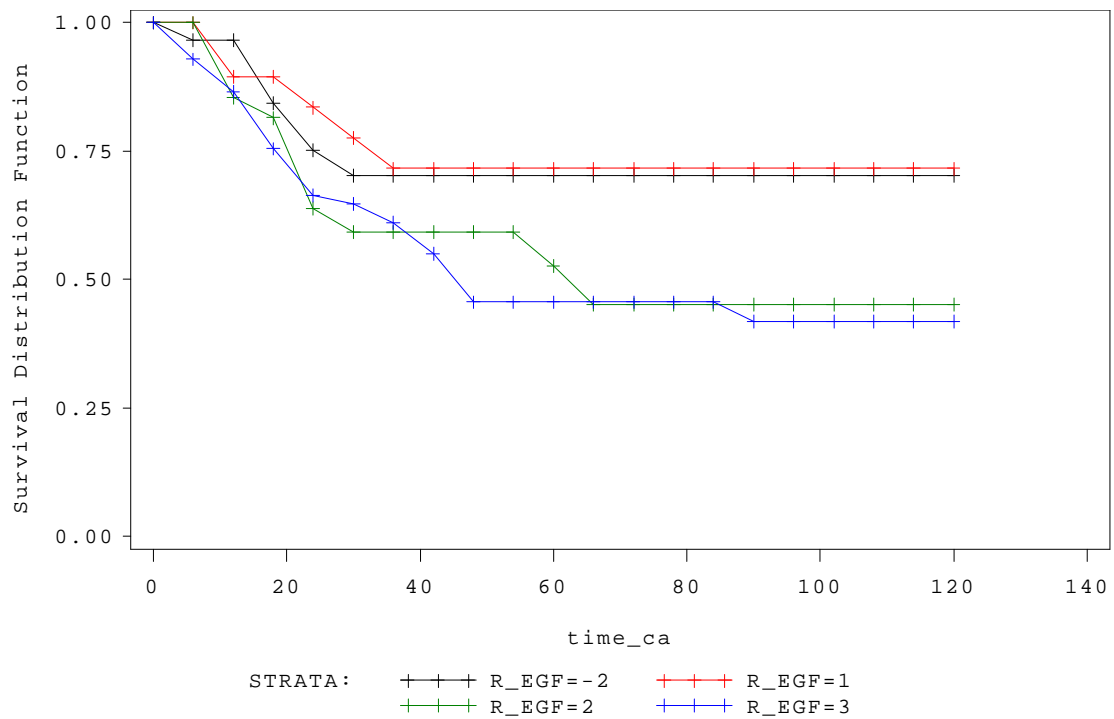
EGFR ++: 59% y 52%

EGFR +++: 61% y 45% $p = 0,17$

Tabla 22. Análisis univariante SLE en función EGFR

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	EGFR	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	-2	31	7	24	77.42
2	1	24	6	18	75.00
3	2	30	12	18	60.00
4	3	85	36	49	57.65
Total		170	61	109	64.12

Figura 9



Hemos agrupado EGFR en dos grupos debido a que EGFR -/+ se comportan de manera muy similar, al igual que sucede con EGFR++/+++:

EGFR-/+ : 68% y 65%

EGFR ++/+++ : 50% y 47%

HR para EGFR ++/+++ 1.83

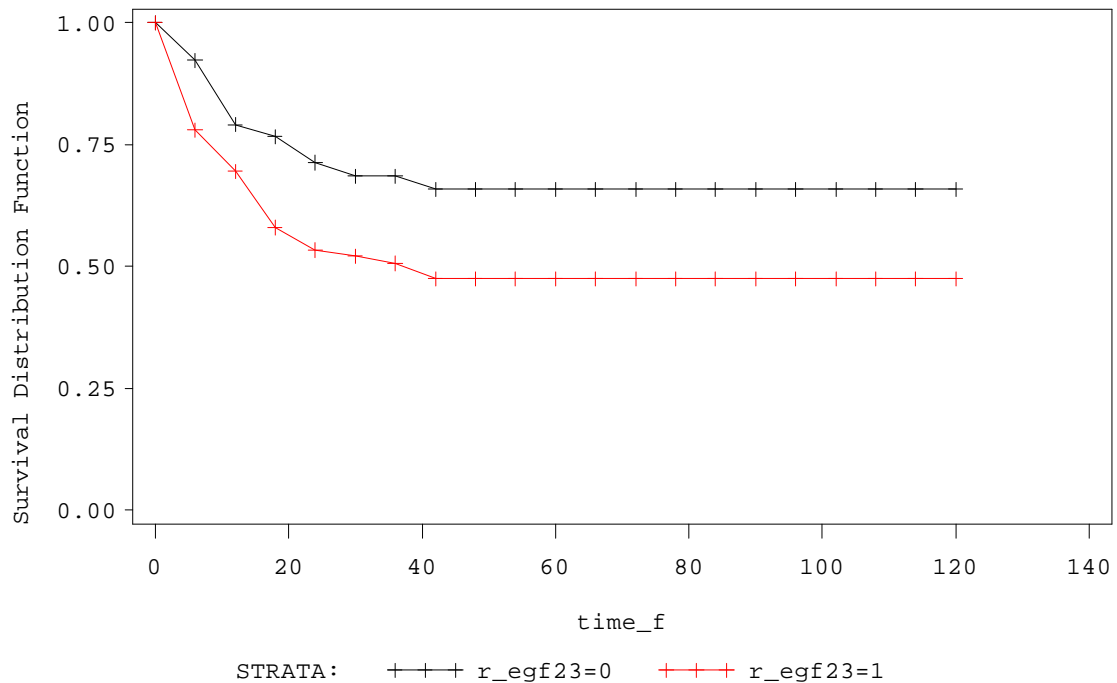
IC 95%: 1.03 - 3.26

p = 0.03

Tabla 23. Análisis univariante SLE en función EGFR agrupado

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	EGFR	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	negativo	55	15	40	72.73
2	positivo	115	53	62	53.91
Total		170	68	102	60.00

Figura 10



8) Determinación de *c-erbB-2*:

c-erbB-2 – : 65% y 62%

c-erbB-2 + : 56% y 47%

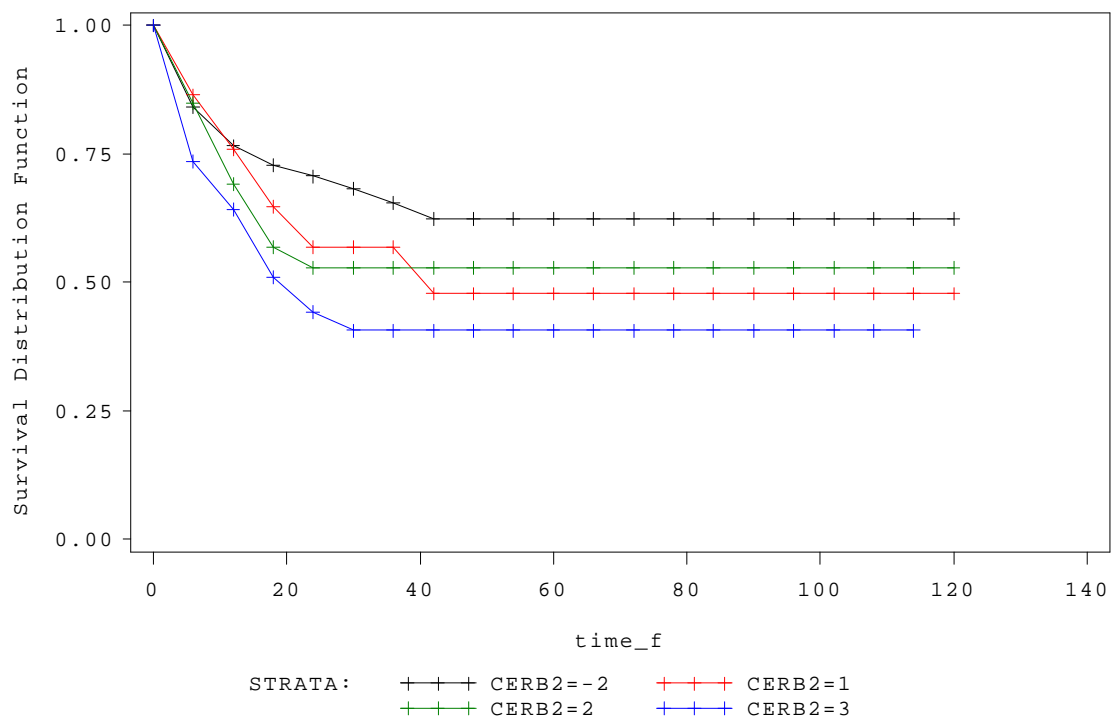
c-erbB-2 ++ : 52% y 52%

c-erbB-2 +++ : 40% y 40% $p = 0,18$

Tabla 24. Análisis univariante SLE en función de *c-erbB-2*

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	<i>c-erbB-2</i>	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	-2	78	23	55	70.51
2	1	30	14	16	53.33
3	2	27	12	15	55.56
4	3	35	19	16	45.71
Total		170	68	102	60.00

Figura 11



Hemos agrupado *c-erbB-2* en dos grupos:

c-erbB-2-/+ / +++: 60% y 56%

c-erbB-2+++ : 40% y 40%

HR para *c-erbB-2*: 1.64

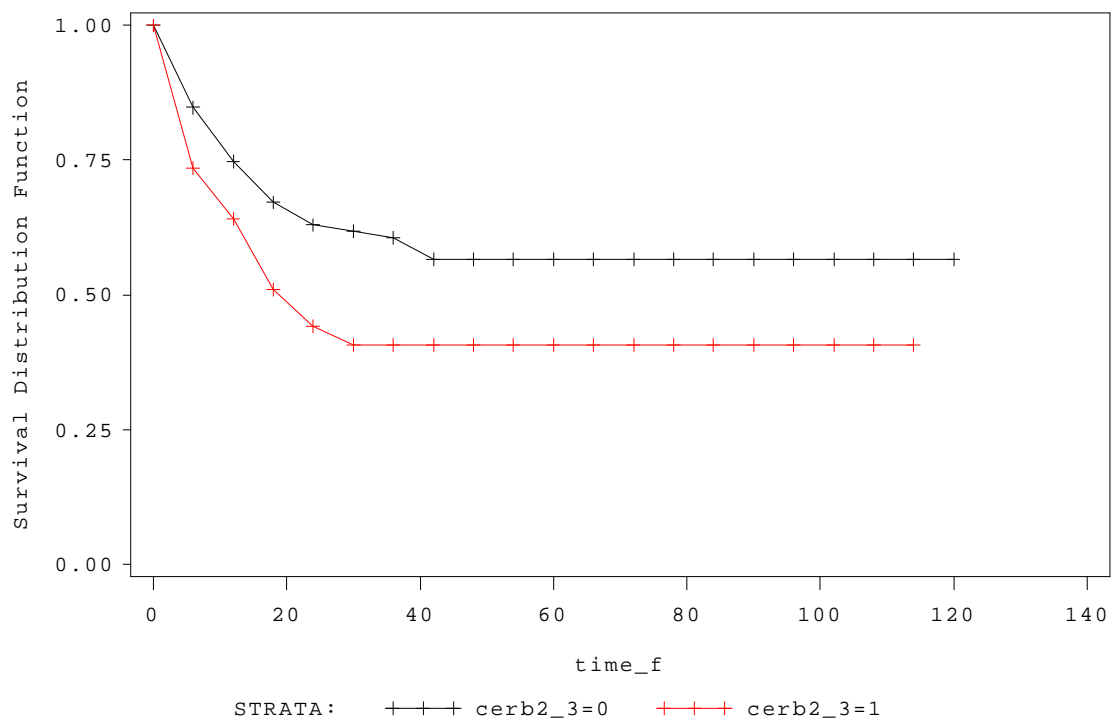
IC 95%: 0.97 - 2.79

p = 0.06

Tabla 25. Análisis univariante SLE en función de *c-erbB-2* agrupado

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	<i>c-erbB-2</i>	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	negativo	135	49	86	63.70
2	Positivo	35	19	16	45.71
Total		170	68	102	60.00

Figura12



9) Supervivencia libre de enfermedad, en función de la combinación de *c-erbB-2* y EGFR agrupados como ambos negativos, ambos positivos o uno de los dos positivos y el otro negativo.

[EGFR y *c-erbB-2* negativo]: 76% y 72%

[EGFR or *c-erbB-2* positivo] : 54% y 49%

[EGFR y *c-erbB-2* positivo] : 39% y 39%

[EGFR or *c-erbB-2* positivo], $p = 0.04$, HR 2.01 (IC 95%: 1.01 - 4.00)

[EGFR y *c-erbB-2* positivo], $p = 0.006$, HR 3.12 (IC 95%: 1.38 - 7.03)

Tabla 26. Análisis univariante SLE en función de *c-erbB-2* y EGFR agrupados

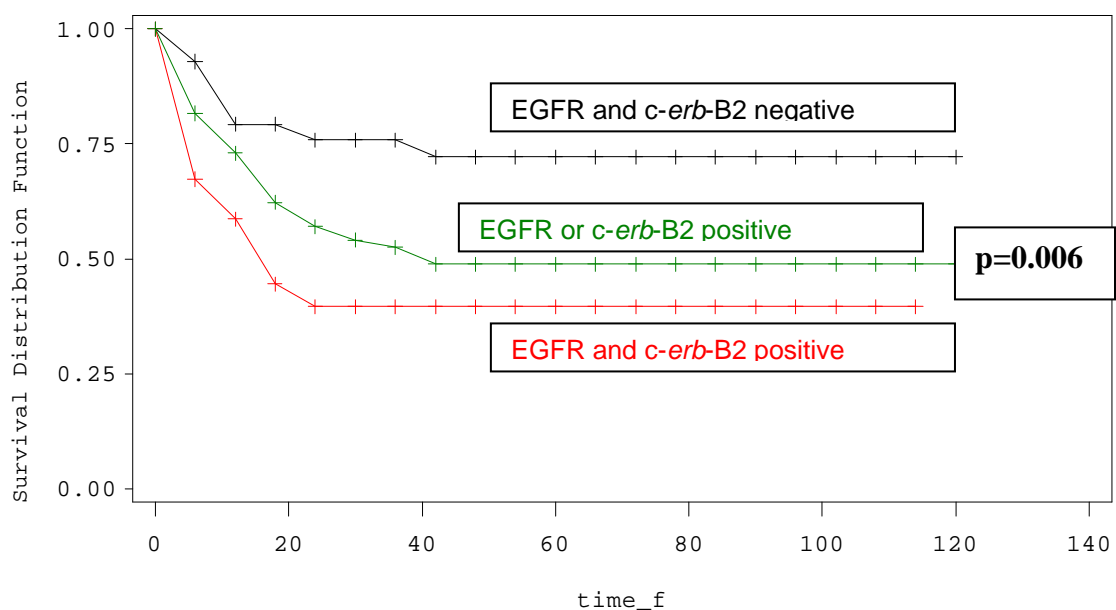
Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso						
Estrato	CR1001	CR11	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	0	0	45	10	35	77.78
2	0	1	25	14	11	44.00
3	1	0	100	44	56	56.00
Total			170	68	102	60.00

*CR1001=1 significa [EGFR or *c-erbB-2* positivo]

CR1001 o CR11=0 significan [EGFR y *c-erbB-2* negativo]

CR11=1 significa [EGFR y *c-erbB-2* positivo]

Figura 13



Análisis multivariante para supervivencia libre de enfermedad de los factores pronósticos estudiados

Hemos construido varios modelos, de menor a mayor complejidad, al ir introduciendo nuevas variables en cada modelo. El primer modelo multivariante, lo hemos construido con variables que hacen referencia a factores pronóstico clásicos, que pueden ser conocidas antes del tratamiento y que además, habían mostrado significación estadística en el análisis univariante. Las variables utilizadas fueron: edad, estado general según ECOG, estadiaje clínico según la clasificación de la FIGO, presencia ganglios linfáticos (pélvicos y/o paraaórticos) en el TAC y la administración de quimioradioterapia concurrente con platino. Hemos utilizado 166 pacientes para cualquier tipo de fracaso (68 eventos, 98 censurados). Todas las variables mantienen su significación estadística.

Tabla 27				
Variable	Pr > ChiSq	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
ECOG 2-3	0.01	2.09	1.19	3.67
FIGO: IIIB-IVA	0.006	2.25	1.25	4.03
Edad ≤ 45	0.01	2.01	1.18	3.42
Platino	0.02	0.54	0.32	0.91
N+ en CT	0.01	2.06	1.18	3.61

Posteriormente hemos incluido la variable **r_egf23** (EGFR ++/+++ vs EGFR -/+), para ver primero su significación estadística, y los posibles efectos que podía tener en el modelo, sobre todo en variables como FIGO que valorá sólo la invasión tumoral, siendo la agresividad biológica mejor valorada por **r_egf23**.

Tabla 28				
Variable	Pr > ChiSq	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
ECOG 2-3	0.005	2.27	1.27	4.03
FIGO: IIIB-IVA	0.01	2.02	1.12	3.66
Edad ≤ 45	0.008	2.05	1.20	3.50
Platino	0.01	0.54	0.32	0.90
N+ en CT	0.005	2.24	1.26	3.96
R_egf23	0.03	1.86	1.03	3.35

Del mismo modo hemos hecho lo mismo para **cerb2_3** (c-erbB-2 +++ vs c-erbB-2 -/+ /++).

Tabla 29				
Variable	Pr > ChiSq	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
Ecog 2-3	0.006	2.20	1.24	3.88
FIGO: IIIB-IVA	0.006	2.25	1.25	4.04
Edad ≤ 45	0.009	2.02	1.18	3.45
Platino	0.05	0.59	0.35	1.00
N+ en CT	0.01	1.98	1.13	3.47
cerb2_3	0.05	1.69	0.98	2.92

Del estudio de las tablas 28 y 29, observamos que tanto la sobreexpresión de EGFR ++/+++ (**r_egf23**) como la de c-erbB-2 +++ (**cerb2_3**) influirían en la supervivencia libre de enfermedad, confirmando un peor pronóstico a estas enfermas. Por tanto, construimos el siguiente modelo con la presencia de ambas variables y vemos que aunque no hay una diferencia estadísticamente significativa si hay una tendencia desfavorable tanto para las pacientes cuyos tumores expresan EGFR ++/+++ como las que expresan c-erbB-2 +++, véase el HR y los intervalos de confianza.

Tabla 30				
Variable	Pr > ChiSq	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
ECOG 2-3	0.004	2.32	1.30	4.14
FIGO: IIIB-IVA	0.02	2.01	1.11	3.66
Edad ≤ 45	0.009	2.04	1.19	3.49
Platino	0.04	0.58	0.34	0.98
N+ en CT	0.01	2.11	1.19	3.75
cerb2_3	0.11	1.56	0.90	2.70
R_egf23	0.06	1.75	0.96	3.17

Por último hemos construido un modelo multivariante introduciendo las combinaciones [EGFR or *c-erb*-B2 positivo], y de [EGFR y *c-erb*-B2 positivo], para estudiar los efectos de la homo y heterodimerización de los receptores de los factores de crecimiento epidérmico en la evolución de nuestras enfermas.

Tabla 31				
Variable	Pr > ChiSq	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
ECOG 2-3	0.002	2.45	1.36	4.39
FIGO: IIIB-IVA	0.01	2.04	1.13	3.70
Edad \leq 45	0.006	2.12	1.23	3.64
Platino	0.03	0.55	0.32	0.94
N+ en CT	0.005	2.29	1.28	4.10
[EGFR or <i>c-erb</i>-B2 positivo]	0.009	2.54	1.25	5.14
[EGFR y <i>c-erb</i>-B2 positivo]	0.01	2.90	1.26	6.66

Vemos como frente a variables clínicas de enorme impacto en el pronóstico de las pacientes con cancer de cérvix, tanto [EGFR or *c-erb*-B2 positivo] como sobre todo [EGFR y *c-erb*-B2 positivo], son factores independientes de mal pronóstico con los hazard ratio más altos en el análisis multivariante lo cual explica la importancia del efecto de la dimerización de estos receptores, tanto la homodimerización como fundamentalmente la heterodimerización.

Análisis univariante para supervivencia libre de fracaso pélvico de los factores pronósticos estudiados

Se ha realizado un análisis univariante para supervivencia libre de fracaso pélvico de los siguientes factores pronósticos: edad, ECOG *performance status*, estadio FIGO, afectación de ganglios linfáticos pélvicos y/o paraaórticos por TAC, la administración de quimioterapia concurrente con cisplatino, y la expresión y coexpresión de EGFR y *c-erbB-2* en la pieza tumoral. La influencia de cada uno de ellos en la SLFP a 3 y 5 años en el análisis univariante ha sido la siguiente:

1) Edad.

SLE a 3 y 5 años ≤ 45 años: 74% y 74%

SLE a 3 y 5 años > 45 años: 51% y 51%

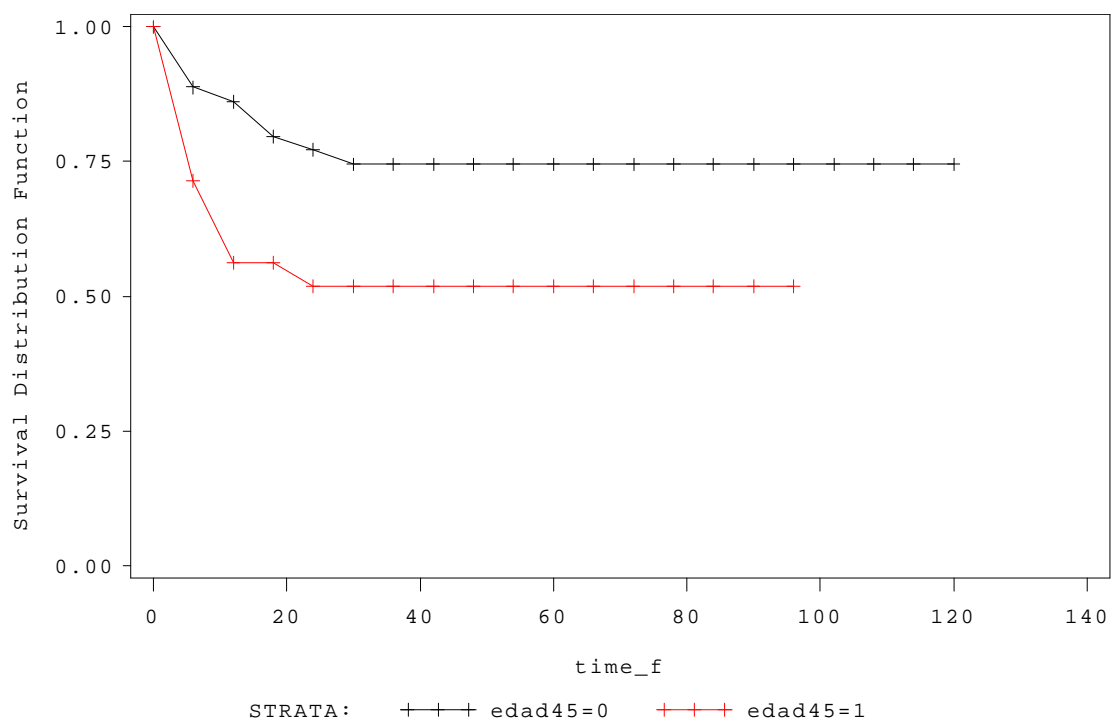
HR para la edad ≤ 45 años 2.59

IC 95%:1.40 – 4.76; $p = 0.002$

Tabla 32. Análisis univariante SLFP de la edad ($\leq a 45$ o > 45)

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	edad45	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	> 45	131	27	104	79.39
2	≤ 45	39	17	22	56.41
Total		170	44	126	74.12

Figura 14



2) Agrupación por ECOG:

ECOG 0-1: 73% y 73%

ECOG 2-3: 47% y 47%

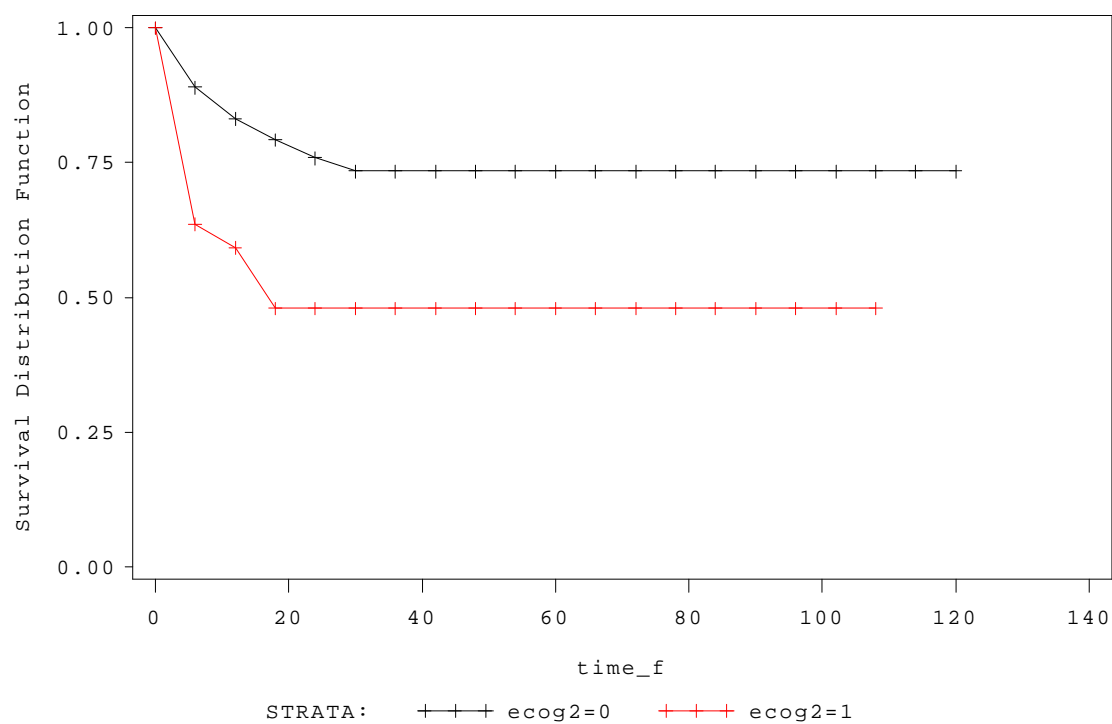
HR para ECOG2-3: 2.89

IC 95%0.0014: 1.51 – 5.55

P = 0.001

Tabla 33. Análisis univariante SLFP de ECOG					
Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	Ecog	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	0/1	141	31	110	78.01
2	2/3	29	13	16	55.17
Total		170	44	126	74.12

Figura 15



3) La agrupación por estadio FIGO:

IB-IIA-IIB: 83% y 83%

IIIB-IVA: 59% y 59%

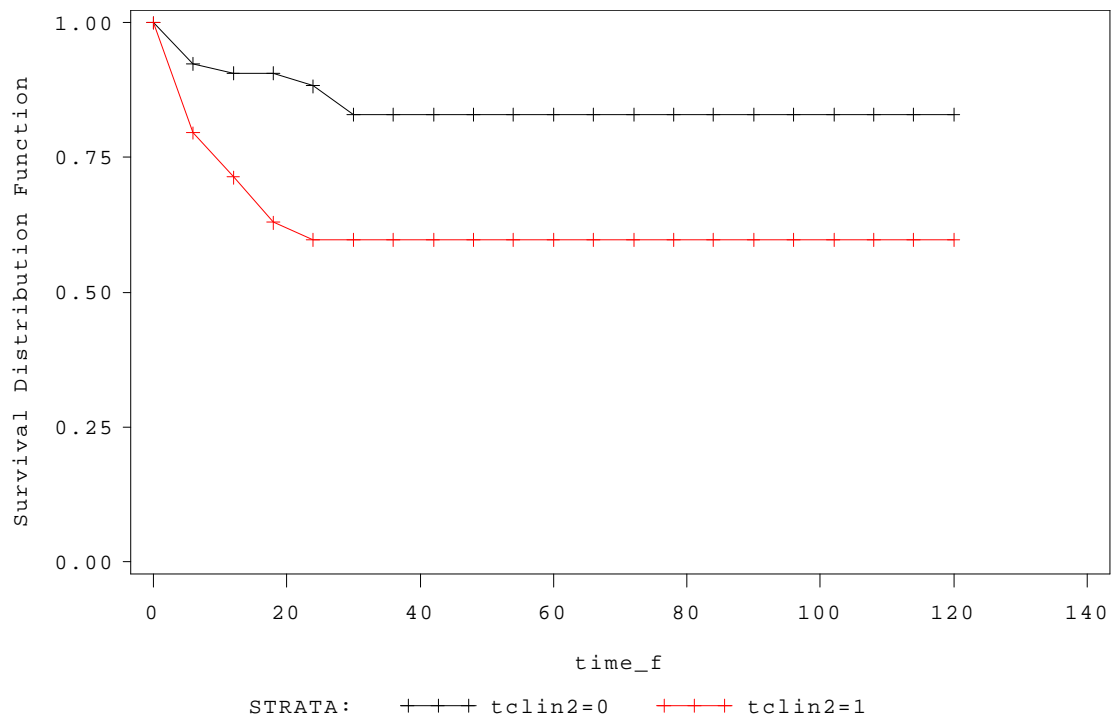
HR para estadios IIIB-IVA frente a IB-IIA-IIB 3.08

IC 95%: 1.48 – 6.41

p = 0.002

Tabla 34. Análisis univariante SLFP por estadio FIGO					
Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	FIGO	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	I-II	68	9	59	86.76
2	III-IV	102	35	67	65.69
Total		170	44	126	74.12

Figura 16



4) Presencia de ganglios por CT:

CTN-: 71% y 71%

CTN+: 53% y 53%

HR para CTN+ 1.64

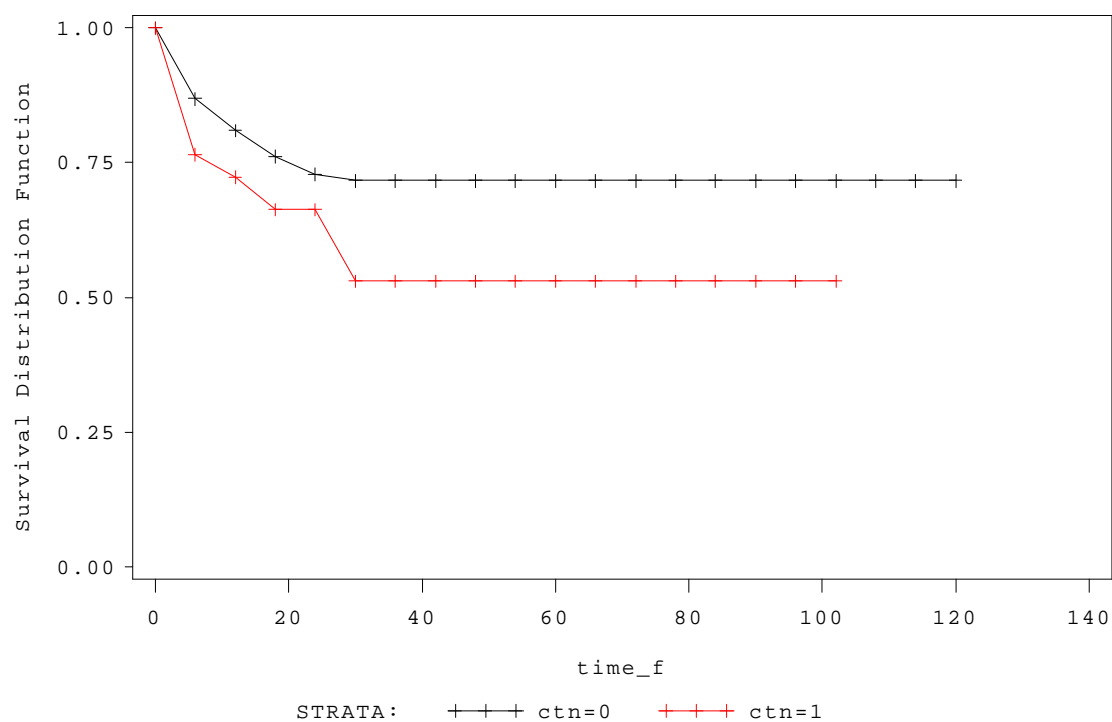
IC 95%: 0.82 – 3.26

p = 0.1

Tabla 35. Análisis univariante SLFP de afectación ganglionar CT

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	CT	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	NO	133	33	100	75.19
2	SI	37	12	26	70.27
Total		170	44	126	74.12

Figura 17



5) Esquema de quimioterapia (166 pacientes):

Sin platino: 58% y 58%

Con platino: 74% y 74%

HR para la quimioterapia con platino 0.55

IC 95%: 0.3 – 0.99

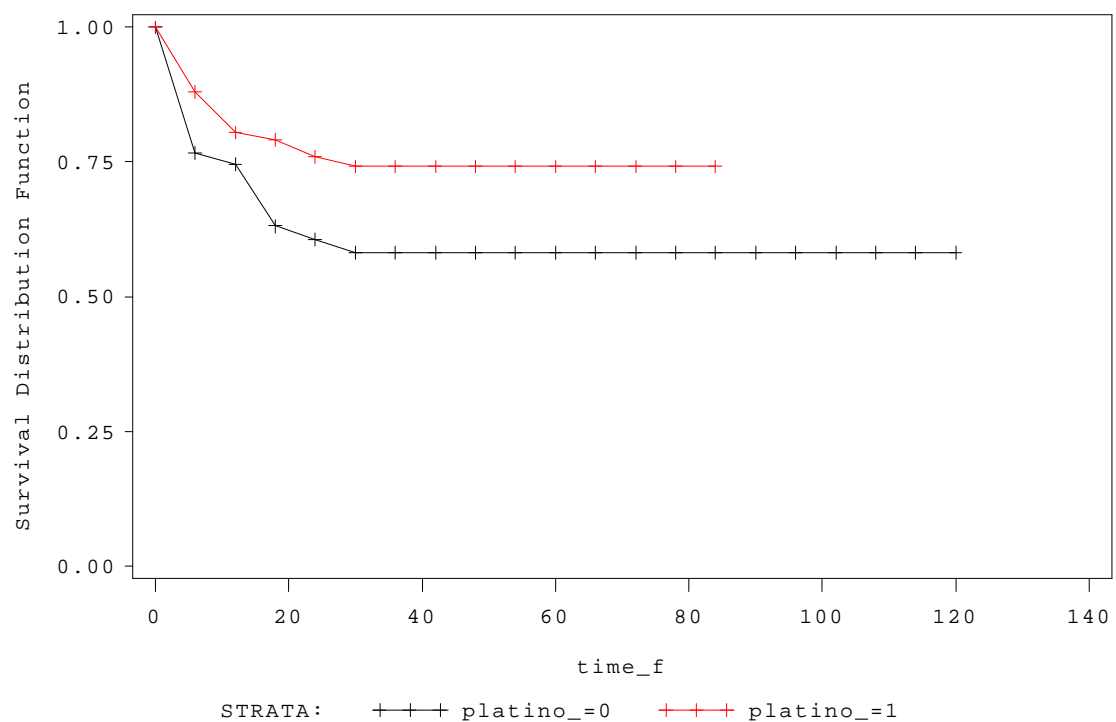
p = 0.04

Tabla 36. Análisis univariante SLFP del tratamiento con o sin cisplatino

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	platino_	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	NO	52	20	32	61.54
2	SI	114	24	90	78.95
Total		166*	44	122	73.49

* 4 pts solo RT con intención radical por motivos ya indicados

Figura 18



6) Determinación de EGFR:

EGFR -: 83 y 83%

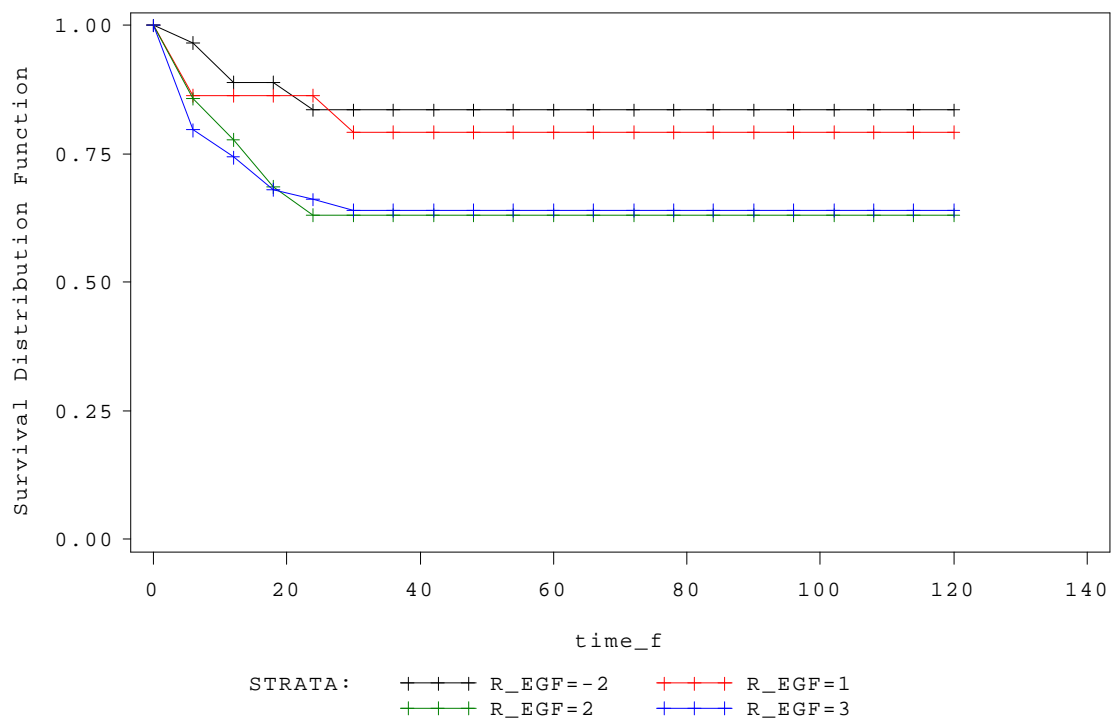
EGFR +: 79% y 79%

EGFR ++: 63% y 63%

EGFR +++: 64% y 64% $p = 0.17$

Tabla 37. Análisis univariante SLFP en función EGFR					
Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	EGFR	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	-2	31	4	27	87.10
2	1	24	4	20	83.33
3	2	30	9	21	70.00
4	3	85	27	58	68.24
Total		170	44	126	74.12

Figura 19



Hemos agrupado EGFR en dos grupos debido a que EGFR -/+ se comportan de manera muy similar al igual que EGFR++/+++:

EGFR-/+ : 81% y 81%

EGFR++/+++ : 63% y 63%

HR para EGFR ++/+++ 2.27

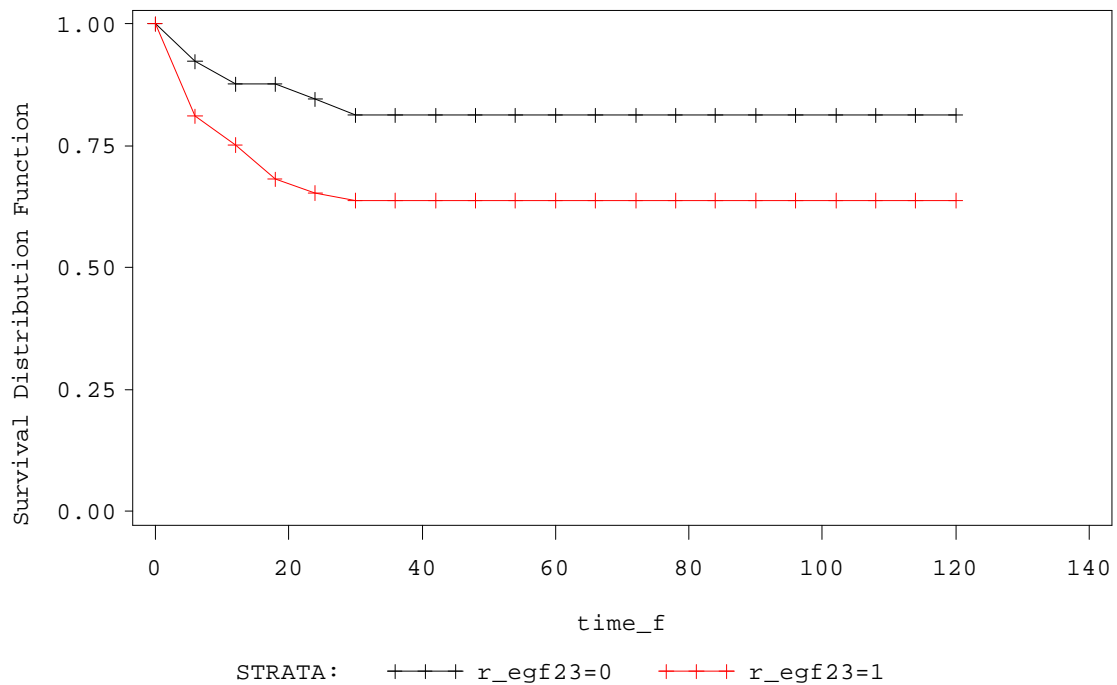
IC 95%: 1.05 - 4.89

p = 0.03

Tabla 38. Análisis univariante SLFP en función EGFR agrupado

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	EGFR	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	negativo	55	8	47	85.45
2	positivo	115	36	79	68.70
Total		170	44	126	74.12

Figura 20



7) Determinación de *c-erbB-2*:

c-erbB-2 – : 75% y 75%

c-erbB-2 + : 71% y 71%

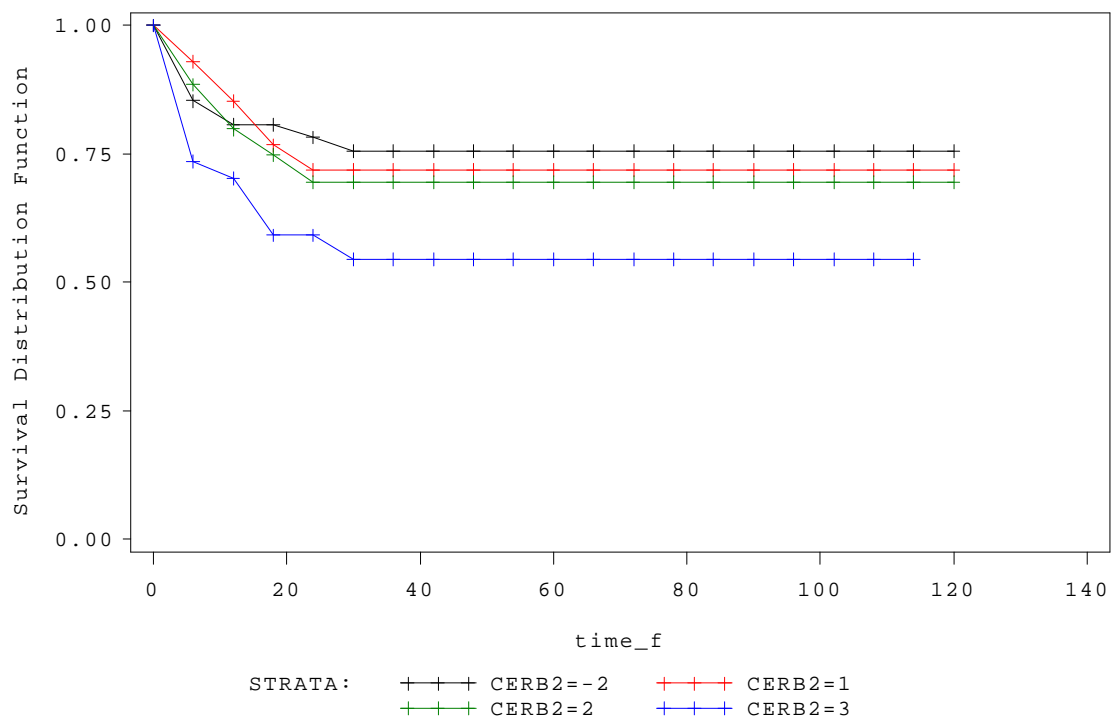
c-erbB-2 ++ : 69% y 69%

c-erbB-2 +++ : 54% y 54% $p = 0,19$

Tabla 39 Análisis univariante SLFP en función de *c-erbB-2*

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	<i>c-erbB-2</i>	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	-2	78	16	62	79.49
2	1	30	7	23	76.67
3	2	27	7	20	74.07
4	3	35	14	21	60.00
Total		170	44	126	74.12

Figura 21



Hemos agrupado *c-erbB-2* en dos grupos:

c-erbB-2-/+ / +++: 73% y 73%

c-erbB-2+++ : 54% y 54%

HR para *c-erbB-2*: 1.96

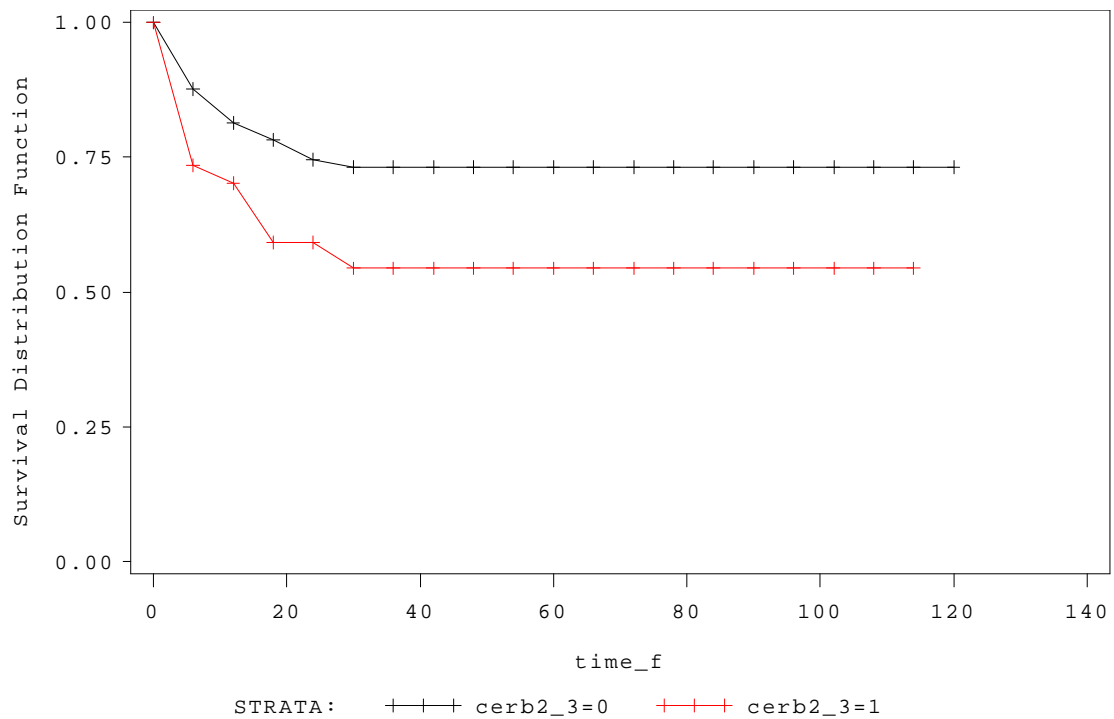
IC 95%:1.04 - 3.70

p = 0.03

Tabla 40. Análisis univariante SLFP en función de *c-erbB-2* agrupado

Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso					
Estrato	<i>c-erbB-2</i>	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	negativo	135	30	105	77.78
2	Positivo	35	14	21	60.00
Total		170	44	126	74.12

Figura 22



8) Supervivencia libre de enfermedad pélvica en función de la coexpresión de *c-erbB-2* y EGFR agrupados como ambos negativos, ambos positivos o uno de los dos positivos y el otro negativo.

[EGFR y *c-erbB-2* negativo]: 83% y 83%

[EGFR or *c-erbB-2* positivo]: 68% y 68%

[EGFR y *c-erbB-2* positivo]: 47% y 47%

[EGFR or *c-erbB-2* positivo], $p = 0.14$, HR 1.93 (IC 95%: 0.79 - 4.69)

[EGFR y *c-erbB-2* positivo], $p = 0.003$, HR 4.29 (IC 95%: 1.60 – 11.42)

Tabla 41. Análisis univariante SLFP en función de *c-erbB-2* y EGFR agrupados

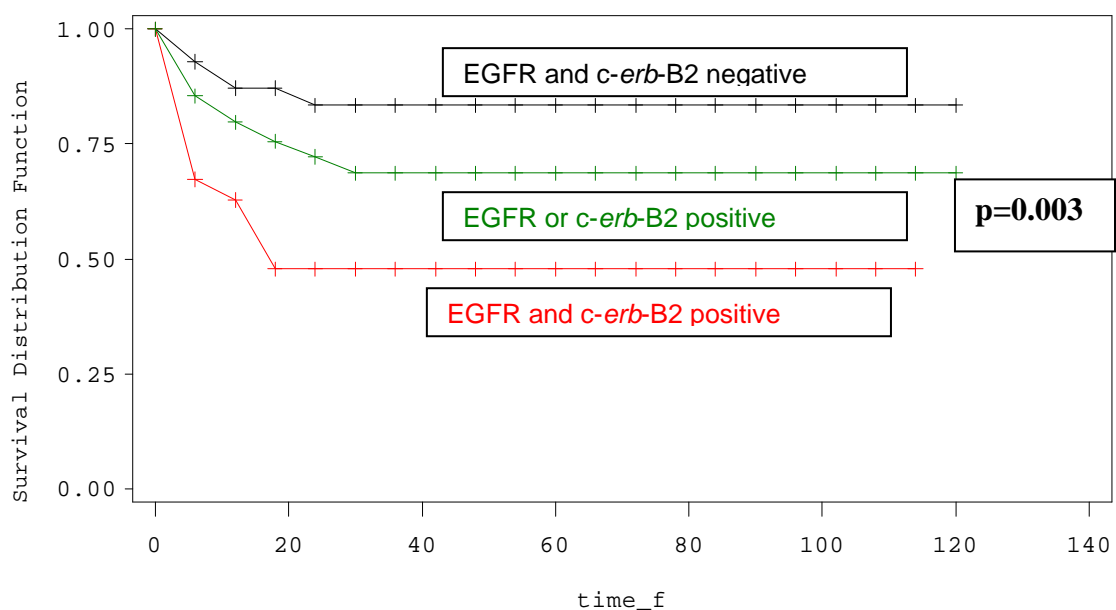
Sumario enfermas con fracaso y sin fracaso						
Estrato	CR1001	CR11	Total	Failed	Censored	Percent Censored
1	0	0	45	6	39	86.67
2	0	1	25	12	13	52.00
3	1	0	100	26	74	74.00
Total			170	44	126	74.12

*CR1001=1 significa [EGFR or *c-erbB-2* positive]

CR1001 o CR11=0 significan [EGFR and *c-erbB-2* negative]

CR11=1 significa [EGFR and *c-erbB-2* positive]

Figura 23



Análisis multivariante para supervivencia libre de fracaso pélvico de los factores pronósticos estudiados

De igual manera que para la SLE, hemos construido varios modelos, de menor a mayor complejidad, introduciendo nuevas variables en cada modelo. El primer modelo multivariante, lo hemos construido con variables que hacen referencia a factores pronóstico clásicos, que pueden ser conocidos antes del tratamiento y que, además, habían mostrado significación estadística en el análisis univariante. Las variables utilizadas fueron: edad, estado general según ECOG, estadiaje clínico según la clasificación de la FIGO, presencia ganglios linfáticos (pélvicos y/o paraaórticos) en el TAC y la administración de quimioradioterapia concurrente con platino. Hemos utilizado 166 pacientes para fracaso local (44 eventos, 122 censurados). Todas las variables mantienen su significación estadística, excepto la presencia ganglionar en el TAC. Desde nuestro punto de vista, este resultado se explica porque la quimioradioterapia concurrente sería muy efectiva en esterilizar los ganglios linfáticos afectados, pero estas pacientes se diseminan a distancia de forma más frecuente que las pacientes que no los tienen. Así, la quimioradioterapia concurrente consigue que la afectación ganglionar no influya en el fracaso pélvico, pero si influye en la SLE.

Tabla 42				
Variable	Pr > ChiSq	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
ECOG 2-3	0.007	2.48	1.27	4.83
FIGO: IIIB-IVA	0.01	2.44	1.15	5.14
Edad ≤ 45	0.001	2.90	1.54	5.48
Platino	0.03	0.50	0.26	0.95
N+ en CT	0.20	1.59	0.77	3.26

Posteriormente hemos incluido la variable **r_egf23** (EGFR ++/+++ vs EGFR -/+), para ver primero su significación estadística, y los posibles efectos que puede tener en el modelo, sobre todo en variables como FIGO que valora sólo la invasión tumoral, siendo la agresividad biológica mejor valorada por **r_egf23**. Esta variable hace que la FIGO pierda importancia en el fracaso pélvico de nuestras enfermas, y explica porque algunas enfermas con tumores avanzados fracasan a nivel pélvico y otras no.

Tabla 43				
Variable	Pr > ChiSq	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
ECOG 2-3	0.003	2.74	1.38	5.43
FIGO: IIIB-IVA	0.06	2.03	0.94	4.36
Edad ≤ 45	0.0008	2.96	1.57	5.59
Platino	0.03	0.50	0.26	0.95
N+ en CT	0.13	1.73	0.83	3.61
R_egf23	0.04	2.27	1.03	5.0

Del mismo modo hemos hecho lo mismo para **cerb2_3** (c-erbB-2 +++ vs c-erbB-2 -/+). Vemos como en este modelo con c-erbB-2, no hace que FIGO pierda significación, pero si el platino.

Tabla 44				
Variable	Pr > ChiSq	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
ECOG 2-3	0.004	2.67	1.35	5.26
FIGO: IIIB-IVA	0.02	2.39	1.13	5.05
Edad ≤ 45	0.001	2.90	1.54	5.48
Platino	0.1	0.58	0.30	1.12
N+ en CT	0.28	1.48	0.72	3.06
cerb2_3	0.03	2.04	1.05	3.95

Del estudio de las tablas 43 y 44 observamos que tanto la sobreexpresión de EGFR ++/+++ (**r_egf23**) como de *c-erbB-2* +++ (**cerb2_3**) son factores independiente para la supervivencia libre de fracaso pélvico, confirmando un mayor riesgo de recaída pélvico. Por tanto, construimos el siguiente modelo con la presencia de ambas variables y vemos que aunque no hay una diferencia estadísticamente significativa si hay una tendencia desfavorable tanto para las pacientes cuyos tumores expresan EGFR ++/+++ como las que expresan *c-erbB-2* +++. En este modelo al no tener en cuenta el efecto de heterodimerización, las variables (**r_egf23**) y (**cerb2_3**) pierden significación al igual que FIGO III-IV y el tratamiento con platino.

Tabla 45				
Variable	Pr > ChiSq	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
ECOG 2-3	0.003	2.83	1.42	5.66
FIGO: IIB-IVA	0.08	1.98	0.91	4.30
Edad \leq 45	0.0009	2.93	1.55	5.54
Platino	0.09	0.56	0.29	1.11
N+ en CT	0.22	1.57	0.75	3.30
cerb2_3	0.07	1.83	0.93	3.56
r_egf23	0.06	2.07	0.93	4.62

Por último hemos construido un modelo multivariante introduciendo las combinaciones [EGFR or *c-erbB-2* positivo], y de [EGFR y *c-erbB-2* positivo], para estudiar los efectos de la homo y heterodimerización de los receptores de los factores de crecimiento epidérmico en la aparición del fracaso pélvico de nuestras enfermas (tabla 46). Vemos como la expresión de [EGFR or *c-erbB-2* positivo] y sobre todo [EGFR y *c-erbB-2* positivo] se asocian a un mayor riesgo de recaída pélvica. Han perdido la significación estadística el estadio FIGO III-IV y el tratamiento con platino.

Tabla 46				
Variable	Pr > ChiSq	Hazard Ratio	95% Hazard Ratio Confidence Limits	
ECOG 2-3	0.002	2.90	1.44	5.83
FIGO: IIB-IVA	0.07	2.00	0.93	4.29
Edad \leq 45	0.0008	2.98	1.57	5.65
Platino	0.08	0.55	0.28	1.09
N+ en CT	0.20	1.62	0.77	3.43
[EGFR or <i>c-erbB-2</i> positivo]	0.05	2.43	0.98	6.06
[EGFR and <i>c-erbB-2</i> positivo]	0.007	3.99	1.44	11.05

10. DISCUSIÓN

El cáncer de cérvix representa el tumor más frecuente y la primera causa de mortalidad por cáncer en las mujeres de países con un mal desarrollo socio-económico e higiénico. A pesar de los avances producidos en los últimos años en el diagnóstico precoz a partir de la citología cervico-vaginal y el tratamiento del cáncer de cérvix invasivo local avanzado mediante el uso concomitante de quimioterapia basada en cisplatino y radioterapia, aproximadamente la mitad de las pacientes morirán consecuencia de la enfermedad.

En la práctica clínica disponemos de factores clínico-patológicos clásicos aceptados a través de los cuales intentamos conocer el curso evolutivo de la enfermedad, pero su utilidad es limitada en cuanto a los comportamientos clínicos heterogéneos en pacientes con tumores que poseen características clínicas similares. En este sentido sería importante conocer nuevos factores pronósticos y predictivos del tumor a nivel molecular que definieran un pronóstico más ajustado y permitieran realizar tratamientos más individualizados. En el Hospital 12 octubre de Madrid hemos analizado la coexpresión de los receptores de factores de crecimiento epidérmico EGFR (Her1) y *c-erbB-2* (Her2) en las biopsias de enfermas con de cáncer de cérvix para establecer su significado clínico.

Pacientes diagnosticadas de carcinoma de cérvix local avanzado: características y análisis de los factores pronósticos clásicos estudiados. Respuesta al tratamiento quimioradioterápico concurrente.

En nuestro estudio se han analizado la expresión de los receptores de factores de crecimiento epidérmico EGFR (Her1) y *c-erbB-2* (Her2) en la pieza histológica de pacientes con cáncer de cérvix local avanzado. Estas pacientes se habían diagnosticado en el Hospital 12 Octubre de Madrid entre diciembre de 1994 y enero de 2007. La edad media fue de 55 años y existía un predominio de tumores con estadios III-IVA (60%) frente a estadios IB-II (40%). El porcentaje de respuestas completas clínica-radiológicas fue alto (77%, es decir en 131 de las 170 pacientes estudiadas) a pesar de la elevada proporción de tumores con estadios avanzados III-IVA (60%) y con un tamaño tumoral mayor de 6 cm (42%).

Como punto de interés, nuestro trabajo se ha realizado prospectivamente sobre una importante población de enfermas con tumores con estadios localmente avanzados de cérvix tratadas con quimio-radioterapia excepto cuatro casos debido a las causas anteriormente citadas.

Como autocritica a nuestro estudio, se utilizaron dos esquemas de quimioterapia. Antes de febrero de 1999, el tratamiento estándar de los carcinomas de cérvix local avanzados era la radioterapia exclusiva. En un intento de mejorar nuestros resultados optamos por investigar la administración concomitante de una fluoropirimidina oral (tegafur). Tras la alerta clínica del NCI, adoptamos el cisplatino como base del tratamiento quimioterápico el cual continúa siendo el estándar actual.

En el análisis univariante de nuestro estudio, todas las variables estudiadas a partir de factores clínico-patológicos (edad, ECOG, estadio según clasificación FIGO, presencia de adenopatías pélvicas y/o paraaórticas en CT, y tratamiento con platino) clásicamente aceptadas como factores pronósticos en el cáncer de cérvix, mostraron significación estadística para la SLE de modo similar a los estudios previamente publicados por otros autores, excepto para el tamaño tumoral. A este respecto nuestras enfermas tenían tumores con predominio de estadios muy avanzados y en ellas el tamaño tumoral no es tan importante. El nivel de corte que hemos elegido ≤ 6 cm. vs. > 6 cm es muy grande y discrimina mal a las enfermas con peor o mejor pronóstico. Clásicamente en estadios IB sabemos que las enfermas con tumores menores o iguales a 4 cm (IB1) tiene mejor evolución que las enfermas con tumores $>$ de 4 cm (IB2), lo que de hecho motivó la modificación de la citada clasificación de la FIGO (26). El nivel de corte elegido por nosotros fue obligado, ya que sólo 20 (12%) enfermas tuvieron tumores ≤ 4 cm, por lo que en tumores tan grandes y con estadios localmente tan avanzados de la FIGO, podemos concluir que el efecto del tamaño tumoral en la SLE es menos relevante que en enfermas con tumores estadios tumorales menos avanzados. Martin-Loeches et al estudiaron factores patológicos en una población de 114 enfermas con tumores de cérvix IA-IIB, y observaron en el análisis multivariante como las enfermas con peor SLE eran aquellas que tenían un volumen tumoral >10 cc y mayor penetración en el estroma (162). Eifel et al sobre una población de 1526 enfermas estadio IB tratadas con radioterapia radical, observaron como las tasas de control pélvico y supervivencia causa específica de enfermedad se relacionaron estrechamente con el diámetro tumoral, y globalmente las enfermas con tumores < 5 cm tuvieron mejor control pélvico y supervivencia causa específica de enfermedad. Pero no existieron diferencias significativas en las tasas de control pélvico o en la supervivencia entre los subgrupos de pacientes con lesiones entre 5 y 7,9 cm de diámetro (74), siendo congruente con nuestros resultados.

En el análisis univariante para SLFP todas las variables también mostraron significación estadística, excepto el tamaño y también la presencia de adenopatías en CT. La quimioradioterapia concurrente es capaz de esterilizar los ganglios linfáticos afectados, pero estas pacientes se diseminan a distancia de forma más frecuente que las pacientes que no los tienen. Así, la quimioradioterapia concurrente consigue que la afectación ganglionar no influya en el fracaso pélvico pero sin embargo, si influye en la SLE.

Los datos consistentes obtenidos respecto a los factores pronósticos clásicamente establecidos en la literatura del cáncer de cérvix junto al número elevado de pacientes incluidos, hace que nuestros resultados tengan una mayor consistencia y validez.

Creemos importante resaltar como el ECOG y la edad se incluyen con muy poca frecuencia en los estudios univariantes o multivariantes en los que se evalúa la expresión de EGFR o *c-erbB-2*, lo que desde nuestro punto de vista es sorprendente. En el análisis multivariante de nuestro estudio la edad menor de 45 años es un factor independiente de mal pronóstico tanto para la SLE ($p=0.006$, HR 2.12; IC: 1.23-3.64) como para SLFP ($p=0.0008$, HR 2.98; IC: 1.57-5.65). Bolli et al (163) observaron como pacientes menores de 40 años tenían una tendencia a una peor SG respecto a pacientes con edad comprendida entre 40-60 años, así como a una menor SLE (50 meses versus 97 meses). Borowsky et al (164) sobre un estudio retrospectivo de 291 enfermas observaron que tan solo la edad estudiada como variable continua y el estadio FIGO se

relacionaban con una mejoría de la supervivencia. Una mayor edad y un estadio tumoral precoz se asociaban significativamente a una mejor supervivencia ($p=0.003$ y $p<0.001$, respectivamente). Sin embargo, para Scambia et al (118) la edad con un nivel de corte diferente, de 50 años, no tuvo significación pronóstica en los análisis univariante y multivariante. Fyles et al (165) en un análisis retrospectivo de 965 pacientes con cáncer invasivo de cérvix tratadas con radioterapia vieron como el estadio avanzado, una edad joven al diagnóstico, la duración del tratamiento, la dosis de radiación, la histología no escamosa, y la afectación ganglionar paraaórtica mediante linfografía resultaron factores pronósticos para SLE y control pélvico de la enfermedad.

Nuestra población de enfermas presenta estadios muy avanzados. Hemos intentado correlacionar la coexpresión de EGFR y/o *c-erbB-2* con el estadio tumoral avanzado, pero no hemos encontrado asociación alguna. Tampoco la hemos hallado entre la coexpresión de *c-erbB-2* y/o EGFR, y las demás variables pronósticas clásicas como la edad, ECOG, presencia de ganglios linfáticos en TAC.

Valor pronóstico de EGFR en el cáncer de cérvix

El receptor del factor epidérmico de crecimiento (EGFR o Her1) pertenece a una familia de receptores de crecimiento con actividad tirosin quinasa. Este receptor está involucrado en procesos celulares que disminuyen la apoptosis e incrementan la proliferación y la angiogénesis. Por otra parte, también influiría en la adquisición de la célula tumoral de mecanismos de resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia (103-105). La sobreexpresión de EGFR esta asociada con una evolución desfavorable en muchos tipos de tumores, incluidos los ginecológicos (106).

Las determinación de EGFR en el cáncer de cérvix y también en otros tipos de tumores, se ha realizado mediante técnicas inmunohistoquímicas que han empleado diferentes anticuerpos y con escores semicuantitativos diferentes no estandarizados (porcentaje de células teñidas +/- intensidad de la inmunotinción). En otras ocasiones se ha medido por técnicas bioquímicas, que cuantifican en fentomoles de proteína / miligramo de tejido procesado, con diferentes puntos de corte. Además las poblaciones de pacientes estudiadas son muy heterogéneas en cuanto a la diversidad de estadios tumorales incluidos (iniciales, avanzados o ambos) y a los diferentes tratamientos administrados (cirugía, radioterapia externa radical, quimioterapia de inducción seguida de cirugía o de radioterapia externa con o sin braquiterapia o de quimioradioterapia adyuvante o de quimioterapia adyuvante...). Esta enorme variabilidad ha dado como resultado en primer lugar un amplio rango de expresión de EGFR en el cáncer de cérvix (6-90%), y en segundo lugar los resultados descritos en la literatura médica sobre su papel pronóstico en el cáncer de cérvix, en general se asocian a un mal pronóstico (113, 115,116, 120, 123-125), pero en ocasiones son controvertidos (114,117-119,121), como ya describimos anteriormente.

En nuestro estudio analizamos la expresión de EGFR en la pieza tumoral mediante un método inmunohistoquímico habitual con un anticuerpo monoclonal clone H11 (Dako, M-3363) considerado estándar para su determinación. Se agruparon las biopsias en dos grupos debido a que EGFR -/+ se comportan de manera muy similar al igual que EGFR++/+++ en el análisis univariante tanto para SLE como para SLFP. De las 170 biopsias de pacientes, 115 casos (68%) son positivas frente a las 55 negativas (32%). Las enfermas con expresión EGFR positiva tienen significativamente una disminución en la SLE y en la SLFP a 3 y 5 años respecto a las negativas (Figuras 10 y 20). En el análisis multivariante tanto para SLE como para SLFP, EGFR positivo se comporta como un factor pronóstico independiente confiriendo a nuestras enfermas una peor evolución clínica. En nuestra casuística no se tuvo en cuenta la intensidad de la inmunotinción por ser un estudio prospectivo. En general los autores que estudian la intensidad de la inmunotinción lo hacen en estudios retrospectivos en los que tiñen multiples cristales de enfermas diferentes a la vez.

En nuestra opinión, esto puede deberse a dos hechos independientes: 1) los tumores EGFR positivos serían más radorresistentes, observándose un mayor índice de fracaso pélvico, y 2) los tumores EGFR positivos serían menos sensibles a cisplatino.

1) El primer punto es congruente con estudios efectuados por diferentes autores. Sheridan et al (166) observaron *in vitro* como la administración de radioterapia a una dosis única de 2 Gy en cultivos de biopsias de pacientes con tumores de cabeza y cuello,

era menos efectiva en presencia de niveles elevados de expresión de EGFR frente a niveles bajos.

Akimoto et al (167) investigaron la relación entre la expresión EGFR y la radiocurabilidad *in vivo* de tumores murinos. En este trabajo los niveles de expresión de EGFR se correlacionaron inversamente con el grado de apoptosis inducida por la dosis de radiación.

Giralt et al (168), en pacientes con cáncer de recto tratados con radioterapia preoperatoria, vieron como la sobreexpresión de EGFR se asoció a un menor número de respuestas completas patológicas y a una disminución de la SLE.

Para Gupta et al (169) la sobreexpresión de EGFR y Akt fosforilado en pacientes con tumores de cabeza y cuello se correlacionaba con una menor radiosensibilidad y un peor control local de los tumores. Estos resultados coinciden con los de Ang et al (170) dónde la expresión de EGFR resultó ser un factor de mal pronóstico para la SLE y la SG, así como un importante predictor de recaída local en este tipo de tumores.

2) Respecto al segundo punto, en nuestro estudio el empleo de cisplatino se correlacionó significativamente con una menor SLE significativa en las pacientes EGFR positivas frente a las negativas. La relación entre la sobreexpresión de EGFR y la quimiosensibilidad a cisplatino permanece en discusión en estudios realizados en cultivos de líneas celulares *in vitro* y en modelos de xenoinjertos.

Ling et al (171) estudió la sensibilidad a varios agentes quimioterápicos de una línea de carcinoma de cérvix escamoso humano ME 180 y de dos subclones resistentes, ME180/TNF y ME180/Pt, los cuales diferían en la expresión de EGFR. Las células ME180/TNF expresaban 6 veces más EGFR que las células ME180, mientras que EGFR apenas se detectaba en células ME 180/Pt. Las células ME180/TNF con una alta expresión de EGFR tenían 3 o 4 veces más sensibilidad a cisplatino, irinotecan y topotecan. Las células ME180/Pt con baja expresión de EGFR tenían entre 5 a 9 veces reducida la sensibilidad a esos mismos fármacos. Dixit et al (172) informaron como el tratamiento de líneas celulares de cáncer de mama MDA-468 con un oligonucleótido RNA antisentido frente a EGFR evitaba la apoptosis inducida por cisplatino, lo cual indicaría la necesidad de un determinado nivel de expresión de EGFR para que cisplatino produzca su efecto citotóxico.

Sin embargo, para Frankel y Mills (173) la presencia de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) protegía a las células tumorales ováricas de la muerte celular inducida por cisplatino. Knecht et al (174), trataron xenoinjertos de tumores humanos con anticuerpos monoclonales anti-EGFR (EMD 72000 y EMD 55900), cisplatino o una combinación de ambos. Cisplatino como agente único no redujo el crecimiento de tumores con alta expresión de EGFR pero si en los de baja expresión. La combinación del anticuerpo más cisplatino produjo una inhibición del crecimiento tumoral que fue independiente del grado de expresión de EGFR, la cual fue superior a la observada en monoterapia. Estos resultados son respaldados por posteriores estudios experimentales que muestran un sinergismo entre cisplatino y la terapia anti-EGFR, bien con anticuerpos o con pequeñas moléculas inhibitoras de

tirosín kinasa, pudiendo constituir un mecanismo para aumentar la sensibilidad de las células tumorales a cisplatino.

Fisher-Colbrie et al (175) reportaron como pacientes con carcinoma de ovario con expresión positiva para EGFR tratadas con ciplatino tenían una menor supervivencia respecto a las EGFR negativa. Scambia et al (176) demostraron en pacientes con cáncer de ovario como la expresión de EGFR no se correlacionaba con parámetros clínico-patológicos como el estadio tumoral, pero si con una peor respuesta a la quimioterapia con cisplatino tras realizar second look, y una peor SLE y SG.

Valor pronóstico de *c-erbB-2* en el cáncer de cérvix

El gen *c-erbB-2*, también denominado HER2, es un protooncogén localizado en el cromosoma 17q23. Codifica una glicoproteína transmembranosa de 185 kDa, que constituye uno de los cuatro miembros de la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y que posee una actividad tirosina kinasa en su dominio intracelular (130). La amplificación del gen *c-erbB-2* y la sobreexpresión de su receptor están implicados en la transformación oncogénica, la proliferación tumoral y el desarrollo de metástasis de determinados tumores malignos como el de mama (134,135). Además su sobreexpresión se ha convertido en uno de los principales factores predictivos de respuesta en el tratamiento del cáncer de mama mediante el anticuerpo monoclonal trastuzumab (137).

La glicoproteína *c-erbB-2* se encuentra sobreexpresada en el cáncer de cérvix entre un 12-70%. Los estudios publicados muestran datos de una posible relación entre la sobreexpresión de *c-erbB-2* y la presencia de estadios más avanzados (151,154), incluso en algunos estudios se ha correlacionado con un peor pronóstico de la enfermedad (147, 148, 150-152, 154, 155, 157), si bien también existen datos controvertidos que no permiten establecer conclusiones definitivas (116,149,153,156). De modo parecido a como ocurre en el estudio de EGFR, estas diferencias pueden ser la consecuencia de la heterogeneidad de las poblaciones de pacientes estudiadas, y de las diferentes técnicas usadas tanto en la preparación de las muestras de los tejidos como en el método inmunohistoquímico con diferentes anticuerpos no estandarizados.

En nuestro estudio analizamos la expresión de *c-erbB-2* en la pieza tumoral mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-*c-erbB-2* policlonal de conejo (Dako; Glostrup. Denmark) considerado estándar para su determinación. Para el análisis estadístico hemos agrupado las biopsias en 135 *c-erbB-2* -/+ /+++ (79.4%) como negativas frente a las 35 *c-erbB-2* +++ (20.6%) positivas. Las enfermas con expresión *c-erbB-2* positiva tienen significativamente una disminución en la SLE y en la SLFP a 3 y 5 años respecto a las negativas (Figuras 12 y 22). En el análisis multivariante tanto para SLE como para SLFP, vemos también como *c-erbB-2* positivo se comporta como un factor independiente de mal pronóstico en nuestras enfermas.

Al igual que ocurría con EGFR estos resultados pueden ser consecuencia de dos hechos independientes: 1) los tumores *c-erbB-2* positivos serían más radiorresistentes, observándose un mayor índice de fracaso pélvico y 2) los tumores *c-erbB-2* positivos serían menos sensibles a cisplatino.

1) El papel potencial de *c-erbB-2* en modular la sensibilidad a la radioterapia se ha sugerido a partir de datos experimentales y de algunos estudios clínicos.

La expresión de *c-erbB-2* en pacientes con carcinomas de esófago se ha comportado como un marcador local de radioquimioresistencia con cisplatino, aunque no se correlacionó con la supervivencia global (177)

Nakano et al (154) observaron en su serie de enfermas con cáncer de cérvix tratadas con radioterapia exclusiva, como las pacientes *c-erbB-2* positivas tenían un

mayor índice de recidivas locales, lo que achacó a que tal sobreexpresión confería una mayor radioresistencia a las células tumorales.

La combinación de radioterapia con un anticuerpo monoclonal anti-*c-erbB-2* inhibe la reparación del daño celular en el DNA causado por la radioterapia, y aumenta la radiosensibilidad de líneas celulares de cáncer de mama que sobreexpresan este oncogen (178).

2) La presencia de *c-erbB-2* pudiera dotar a las células de un fenotipo de resistencia a la quimioterápicos, entre ellos el cisplatino.

Benz et al (134) demostraron como la transfección *c-erbB-2* a la línea celular MCF-7 de cáncer de mama resultaba en un incremento 2-3 veces de la resistencia a cisplatino, pero no afectaba a la sensibilidad de 5-FU y doxorubicina. De igual forma, líneas celulares de cáncer de pulmón con sobreexpresión de la proteína *c-erbB-2* se mostraron resistentes a cisplatino (179, 180).

En un estudio de Pergram et al, la sensibilidad a cisplatino disminuyó significativamente en determinadas líneas celulares de cáncer de mama y ovario con *c-erbB-2* transferido, pero no en otras. La influencia de *c-erbB-2* sobre la sensibilidad a cisplatino fue específica del tipo celular pero no genérica (181)

Tsai et al (180) observaron *in vitro* como líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico con sobreexpresión de *c-erbB-2* tenían una alta actividad del mecanismo reparador del daño en el DNA por cisplatino, *nucleotide excision repair*, y consecuentemente una mayor resistencia al efecto citotóxico del cisplatino. El uso de un anticuerpo monoclonal anti-*c-erbB-2* aumentaría la sensibilidad a cisplatino en líneas celulares *c-erbB-2* positivas (182).

Estos resultados sugieren como el uso de un anticuerpo anti-*c-erbB-2* combinado a un tratamiento radioquimioterápico con cisplatino pudiera mejorar la respuesta en tumores *c-erbB-2*, entre ellos el cáncer de cérvix.

Importancia de la coexpresión de EGFR y *c-erbB-2* en el cáncer de cérvix; efecto de la dimerización.

La familia de los receptores de crecimiento epidérmico interviene en el control del ciclo celular, en la apoptosis, en la angiogénesis, y en la capacidad de invasión y metástasis, a través de diferentes mecanismos de activación de esta vía como son: 1) la amplificación del gen EGFR no mutado, con una sobreexpresión del receptor, 2) la expresión del gen EGFR mutado con alteraciones estructurales del receptor que están constitutivamente activadas en ausencia de ligando, 3) la hipersecreción autocrina de ligandos (EGF, TGF- α) a los que responden con un mecanismo de retroalimentación positiva denominado “loop autocrino”, y 4) la activación de EGFR mediante la formación de heterodímeros en presencia de otros receptores de factores de crecimiento epidérmico, fundamentalmente *c-erbB2*, como es el estudio que aquí nos ocupa.

Este es el primer estudio que demuestra prospectivamente en un análisis multivariante con variables clínicas de gran peso en el pronóstico del cáncer de cérvix (edad, ECOG, estadio según clasificación FIGO, presencia de adenopatías pélvicas y/o paraaórticas en CT, y tratamiento con platino), como la coexpresión de EGFR y *c-erbB-2* constituye un factor independiente de mal pronóstico para SLE and SLFP. La SLE y la SLFP a 3 y 5 años son significativamente más cortas para pacientes con tumores [EGFR or *c-erbB-2* positivo] y sobre todo en los [EGFR y *c-erbB-2* positivos], en contraste con los tumores [EGFR y *c-erbB-2* negativos].

En nuestra opinión ello podría deberse a una mayor agresividad intrínseca de estos tumores que les confiere el efecto de la homodimerización y sobre todo la heterodimerización, con una mayor resistencia a la radioterapia y una menor sensibilidad a cisplatino. Como hemos analizado anteriormente, existen datos de estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran como individualmente, la sobreexpresión de EGFR y de *c-erbB-2* se asocian a una mayor resistencia a la radioterapia y a una menor sensibilidad a cisplatino en diversos tipos de tumores.

La formación de heterodímeros y la unión a sus ligandos constituye un complejo entramado presente en la mayoría de los carcinomas primarios humanos que favorece el reclutamiento de un número mayor de señales intracelulares activadas involucradas en el crecimiento, la supervivencia y la capacidad de metastatizar de las células tumorales. *c-erbB-2* tiene un papel central en esta familia y es la pareja preferida para formar dímeros con otros receptores (131-132). Los heterodímeros constituidos entre EGFR y *c-erbB-2* son más potentes que los homodímeros de EGFR, debido a que *c-erbB-2* produce una activación más amplia, y sobre todo más prolongada de las señales de crecimiento y proliferación celular (137,183).

Estudios *in vitro* e *in vivo* a partir de otros tipos de tumores, son congruentes con nuestros resultados en pacientes con cáncer de cérvix, y subrayan la importancia de la cooperación entre los receptores de la familia de EGFR en inducir la transformación oncogénica. Kokai et al (184) demostraron como la cooperación entre EGFR y *c-erbB-2* inducía una transformación acelerada en fibroblastos. La sobreexpresión de p185c-neu en células NIH:3T3 en roedores no inducía una transformación oncogénica, pero la sobreexpresión simultánea de p185c-neu y EGFR si la producía. Estos resultados fueron confirmados en estudios posteriores (185, 186, 187). La sobreexpresión de un solo receptor por si mismo pudiera ser insuficiente para la transformación oncogénica y se

necesitaría la colaboración de al menos dos receptores y de ligandos apropiados que favorecerían este proceso al diversificar la inducción de la respuesta biológica. No obstante, la potencia de transformación oncogénica de los diferentes heterodímeros de la familia EGFR no parece ser idéntica. Cohen et al (187) mostraron como cualquier combinación de receptores EGFR era capaz de inducir *in vitro* una transformación de células NIH: 3T3. Sin embargo, el heterodímero EGFR / c-erbB-2 era el único capaz de producir *in vivo* la transformación a un fenotipo tumoral.

En algunos sistemas experimentales la inactivación de c-erbB-2 es requerida para bloquear la transformación mediada por EGFR (188,189). Inversamente altos niveles de EGFR impiden la eficacia de trastuzumab frente a células tumorales con c-erbB-2 amplificado, y esta resistencia es revertida por inhibidores de EGFR (190). La terapia del anticuerpo anti-EGFR C225 es sinérgica con anticuerpos monoclonales anti-c-erbB-2 en líneas celulares de cáncer de ovario que sobreexpresan c-erbB-2 (191). Finalmente gefitinib inhibe la fosforilación de c-erbB-2 *per se* y el crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama (192, 193, 194), y potencia el efecto antitumoral de trastuzumab en xenoinjertos de cáncer de mama en ratones (194).

Varios estudios clínicos han reportado como en algunos tipos de tumores, la coexpresión de c-erbB-2 y EGFR se asocia a un comportamiento biológico más agresivo y un peor pronóstico en estos pacientes frente a la expresión de un solo receptor.

Brabender et al (195) vieron como la expresión de EGFR en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico sólo se correlacionaba con un pronóstico desfavorable cuando existía una expresión conjunta de EGFR y de c-erbB-2, lo cual sucedía en el 17% de los casos. Estos resultados son consistentes con los de Tateishi et al (196) que informaron una coexpresión de ambos receptores en un 13% de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, y se asoció con una menor supervivencia global a 5 años.

DiGiovanna et al (197) encontraron como la mayoría de carcinomas de mama no avanzado que expresaban EGFR, también coexpresaban c-erbB-2 (87%), y ello se asociaba a una supervivencia más corta de las enfermas. Otros autores (198,199) confirmaron estos resultados de tal modo que la sobreexpresión de ambos receptores mostraba una peor evolución clínica en comparación a la expresión de uno solo de ellos. Ello indicaría que la expresión de ambos receptores tendría un efecto sinérgico e influiría en el peor pronóstico de las pacientes con cáncer de mama.

Estudios adicionales han mostrado como la coexpresión de diferentes receptores se asocia a un peor pronóstico frente a la expresión de un solo receptor en pacientes con carcinomas de colon, de células transicionales de vejiga y escamosos de cabeza y cuello (200, 201, 202).

Por tanto, nuestro trabajo es el primero que describe el efecto adverso de la coexpresión de ambos receptores, EGFR y c-erbB-2, en pacientes con cáncer de cérvix no operadas y tratadas con quimioradioterapia concomitante.

Nuevas enfoques terapéuticos en el cáncer de cérvix a partir de estos resultados

La formación de heterodímeros podría influir en la respuesta a los tratamientos oncológicos clásicos como la quimioterapia y la radioterapia, y constituir una nueva aproximación terapéutica mediante el desarrollo de terapias biológicas dirigidas. Respecto a posibles nuevos enfoques terapéuticos en el cáncer de cérvix destacamos dos conceptos, al menos demostrados en estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo*.

En primer lugar la terapia anti-EGFR potenciaría, al menos parcialmente, el efecto antitumoral de cisplatino y aumentaría la radiosensibilidad. En 1987 se publicó como el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-EGFR combinado con cisplatino tenía efectos antitumorales aditivos o sinérgicos en un modelo de ratones lampiños. Este trabajo estimuló la hipótesis de que el bloqueo del receptor aumentaba los efectos antitumorales de cisplatino (204). De modo similar ocurría con cisplatino en combinación con un anticuerpo monoclonal anti- *c-erbB-2* en líneas celulares de cáncer de mama y de ovario (182). El Dr Fan estudió en xenoinjertos de carcinoma epidermoide que no respondían a cetuximab o a cisplatino a las máximas dosis toleradas, como la combinación de ambas terapias conseguía erradicar los tumores (205). A partir de estas observaciones preclínicas se han realizado los primeros ensayos clínicos fundamentalmente en tumores de cabeza y cuello dónde se ha visto como en pacientes con tumores refractarios a cisplatino, la adición de cetuximab consigue tasas de respuestas entre un 11.5% y 23% (108). El bloqueo de EGFR combinado con la radioterapia también se ha evaluado. La combinación de cetuximab o gefitinib aumentaba la radiosensibilidad en líneas celulares cultivadas (206) y en xenoinjertos de líneas celulares de carcinoma epidermoide A431 (207).

En segundo lugar, la interacción funcional entre los receptores de la familia EGFR justificaría la hipótesis del uso combinado de terapias anti-EGFR para obtener un bloqueo funcional más eficiente y una mayor actividad antitumoral. Varios estudios han demostrado como la respuesta a la terapia con fármacos anti-EGFR no se correlaciona con los niveles de expresión del receptor (110-112), lo cual podría estar justificado porque niveles bajos de expresión del receptor son suficientes para coactivarse junto a la presencia de otros receptores, fundamentalmente *c-erbB-2*. Diermeier et al (208) observaron en dos líneas celulares de cáncer de mama como trastuzumab inhibía más el crecimiento tumoral en aquella línea celular con sobreexpresión de *c-erbB-2*, mientras que la línea celular que sobreexpresaba *c-erbB-2* y EGFR era menos susceptible a trastuzumab. La adición de trastuzumab a gefitinib frente a líneas celulares de cáncer de mama produce un efecto antitumoral sinérgico (193,194). Gefitinib también inhibe la proliferación de líneas celulares de adenocarcinomas de mama que expresan EGFR y concentraciones elevadas de *c-erbB-2*. El tratamiento combinado de gefitinib y trastuzumab produce una mayor actividad antitumoral, que se traduce en el nivel de apoptosis de las células cultivadas (183,192).

Se están desarrollando una nueva clase de anticuerpo que se unen al receptor *c-erbB-2* e impiden la formación de heterodímeros independiente del nivel expresión de *c-erbB-2*, como es el pertuzumab (2C4). Existen también nuevas pequeñas moléculas inhibitoras de la actividad tirosin kinasa de diferentes miembros de la familia EGFR. Lapatinib (GW572016) es un inhibidor dual de EGFR y *c-erbB-2* que mostró una inhibición mayor del crecimiento de células de cáncer de colon activadas por TGF α que

la de los antagonistas dirigidos sólo contra los receptores erbB1 o erbB2, lo cual indicaría que un inhibidor doble podría proporcionar mayor beneficio terapéutico que la inhibición frente a cada uno de los receptores por separado (209). La actividad de lapatinib está siendo evaluada en pacientes con cáncer de mama metastásico *c-erbB-2* positivos refractarios a trastuzumab (210) con resultados favorables.

Todos estos datos apoyarían el diseño de nuevos estudios clínicos en pacientes con cáncer de cérvix con terapias anti-EGFR y anti- *c-erbB-2* en combinación a la quimioradioterapia concurrente con cisplatino.

11. CONCLUSIONES

Sobre el objetivo primario

La coexpresión de EGFR y *c-erbB-2* se asoció significativamente a una peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de fracaso pélvico en nuestras pacientes.

Sobre los objetivos secundarios

1. La coexpresión de EGFR y *c-erbB-2* se produjo en el 15% de las pacientes, y la sobreexpresión de EGFR o *c-erbB-2* en el 59% de las pacientes. Un 26% de las enfermas no presentaron sobreexpresión de ninguno de los dos receptores.
2. La coexpresión de EGFR y *c-erbB-2* no se correlacionó con la agrupación por estadios de la FIGO del tumor, ni con ninguna otra variable pronóstica clásica estudiada.
3. La sobreexpresión de EGFR, de *c-erbB-2*, y fundamentalmente la coexpresión de ambos receptores, se asociaron significativamente a una mayor probabilidad para fracaso pélvico.
4. Las variables clínicas clásicas que resultaron ser factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de enfermedad fueron la edad, el estadio FIGO, el EGOG, la terapia con cisplatino y la presencia de ganglios linfáticos positivos en CT. Para la supervivencia libre de fracaso pélvico todos ellos también fueron factores pronósticos independientes excepto la presencia de ganglios positivos en CT.
5. Desde nuestro punto de vista es necesario explorar la utilización de terapias dirigidas frente a estos receptores de la familia EGFR, combinadas con el tratamiento quimioradioterápico concurrente con cisplatino.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Pisan P, Parkin DM, Bray F and Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 83: 18-29.
2. Landis SH, Murria T, Bolden S and Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 8-31.
3. Parkin DM, Muir C, Whelan SL, et al. Cancer incidence in five continents. Lyon: *International Agency for Research on Cancer*, 1993.
4. National Cancer Institute: Cancer Vaccine Fact Sheet. Available at <http://www.nci.nih.gov/cancertopics/factsheet/cancervaccine>.
5. Cannistra SA, Niloff JM. Cancer of the uterine cervix. Review articles. *N Engl J Med* 1996; 334: 1030-1038.
6. Herrero R. Epidemiology of cervical cancer. *Mongr Natl Cancer Inst* 1996; 21: 1-11.
7. Benda JA. Histopathologic prognostic factors in early stage cervical carcinoma. *Mongr Natl Cancer Inst* 1996; 21: 27-34.
8. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992; 327: 1272.
9. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990; 248: 76-79.
10. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990; 63: 1129-36.
11. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; 75: 495-505.
12. Munger K, Werness BA, Dyson N, et al. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989; 8: 4099-4105.
13. Chellappan S, Kraus VB, Kroger B, et al. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between the transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4549-53.

14. Vogelstein B, Kinzler K. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138-141.
15. Hu G, Liu W, Mendelsohn J, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and papillomavirus E6/E7 proteins in cervical carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1271-76.
16. Crusius K, Auvinen E and Alonso A. Enhancement of EGF and PMA mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. *Oncogene* 1997; 15: 1437-44.
17. Akerman GS, Tolleson WH, Brown KL, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signalling shortens the life span of normal human keratinocytes. *Cancer Res* 2001; 61: 3837-43.
18. Sizemore N and Rorke E. Human papillomavirus 16 immortalization of normal human ectocervical epithelial cells alters retinoic acid regulation of cell growth and epidermal growth factor receptor expression. *Cancer Res* 1993; 53: 4511-17.
19. Lee D, Kim HZ, Jeong KW, et al. Human papillomavirus E2 down-regulates the human telomerase reverse transcriptase promoter. *J Biol Chem* 2002; 277: 27748-56.
20. Duensing S, Duensing A, Crum CP, et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res* 2001; 61: 2356-60.
21. Zhang A, Maner S, Betz R, et al. Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 2002; 101: 427-33.
22. Wolf JK and Ramirez PT. The molecular biology of cervical cancer. *Cancer Investigation* 2001; 19 (6): 621-29.
23. Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda system. Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*; 287 (16): 2114-19.
24. Wright TC, Cox JT, Massad LS, et al. 2001 consensus guidelines for the management of woman with cervical cytological abnormalities. *JAMA*; 287 (16): 2120-29.
25. Smith RA, Cokkinides V, von Eschenbach AC, et al. American Cancer Society Guidelines for the early detection of cancer. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 8-22.

26. Sheperd JH. International Federation of Gynecology and Obstetrics. Staging announcement: FIGO staging of gynecological cancers: cervical and vulva. *Int J Gynecol Cancer* 1995; 5: 319.
27. Heller PB, Malfetano JH, Bundy BN, et al. Clinical-pathologic study of stage IIB, III, and IVA carcinoma of the cervix: extended diagnostic evaluation for paraaortic node metastasis. A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 1990; 38: 425-30.
28. Ebner F, Tamissimo K, Kressel NY. Magnetic resonance imaging in cervical carcinoma: diagnosis staging and follow-up. *Magnetic Resonance Quarterly* 1994; 10: 22.
29. Rose PG, Adler LP, Rodríguez M, et al. Positron emission tomography for evaluating para-aortic nodal metastasis in locally advanced cervical cancer before surgical staging: A surgicopathologic study. *J Clin Oncol* 1999; 17: 41-45.
30. Grigsby PW, Siegel BA and Dehdashti F. Lymph node staging by positron emission tomography in patients with carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3745-49.
31. Lozza L, Merola M, Fontanelli R, et al. Cancer of the uterine cervix: clinical value of squamous cell carcinoma antigen (SCC) measurements. *Anticancer Res* 1997; 17: 525-29.
32. Bolger BS, Dabbas M, Lopes A, et al. Prognostic value of preoperative squamous cell carcinoma antigen level in patients surgically treated for cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1997; 65: 309.
33. Duk JM, Groenier KH, de Bruijn HWA, et al. Pretreatment serum squamous cell carcinoma antigen: a newly identified prognostic factor in early-stage cervical carcinoma. *J Clin Oncol* 1996; 14: 111.
34. Hong JH, Tsai CS, Chang JT, et al. The prognostic significance of pre- and posttreatment SCC levels in patients with squamous cell carcinoma of the cervix treated by radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41: 823.
35. Massuger LF, Koper NP, Thomas CM, et al. Improvement of clinical staging in cervical cancer with serum squamous cell carcinoma antigen and CA 12.5 determinations. *Gynecol Oncol* 1997; 64: 473.
36. Reesink-Peters N, van der Velden J, Hoor KA, et al. Preoperative serum squamous cell carcinoma antigen levels in clinical decision making for patients with early-stage cervical cancer. *J Clin Oncol* 2005; 7: 1455-62.

37. Meier W, Stieber P, Hasholzner U, et al. Prognostic significance of squamous cell carcinoma antigen in primary advanced and recurrent cervical carcinoma. *Anticancer Res* 1997; 17: 2959-62.
38. Tattersall, M H. Concomitant and neoadjuvant chemotherapy in conjunction with radiotherapy in the management of locally advanced cervical cancer. *J Natl Cancer. Inst Monogr* 1996; 21: 101-3.
39. Tattersall MH, Larvidhaya V, Vootiprux V, et al. Randomized trial of epirubicin and cisplatin chemotherapy followed by pelvic radiation in locally advanced cervical cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 444-51.
40. Chauvergne J, Rohart J, Heron JF, et al. Randomized trial of initial chemotherapy in 151 locally advanced carcinoma of the cervix (T2b-N1, T3b, M0). *Bull Cancer* 1990; 77 (10): 1007-24.
41. Sundorf K, Trope CG, Hogberg T, et al. Radiotherapy and neoadjuvant chemotherapy for cervical carcinoma. A randomized multicenter study of sequential cisplatin and 5-fluorouracil and radiotherapy in advanced cervical carcinoma stage IIIB and IVA. *Cancer* 1996; 77 (11): 2371-78.
42. Chiara S, Bruzzone M, Merlini L, et al. Randomized study comparing chemotherapy plus radiotherapy versus radiotherapy alone in FIGO stage IIB-III cervical carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1994; 17(4): 294-97.
43. Kumar L, Kaushal R, Nandy M, et al. Chemotherapy followed by radiotherapy versus radiotherapy alone in locally advanced cervical cancer: a randomized study. *Gynecol Oncol* 1994; 54 (3): 307-15.
44. Potish RA and Twigg LB. On the lack of demonstrated clinical benefit of neoadjuvant cisplatin therapy for cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 27: 975-79.
45. Stehman FB and Bundy BN. Carcinoma of the cervix treated with chemotherapy and radiation therapy. Cooperative studies in the Gynecologic Oncology Group. *Cancer* 1993; 71 (suppl 4): 1697-1701.
46. Tseng CJ, Chang CT, Lai CH, et al. A randomized trial of concurrent chemoradiotherapy versus radiotherapy in advanced carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1997; 66 (1):52-58.
47. Leibel S, Bauer M, Wasserman T, et al. Radiotherapy with or without misonidazole for patients with stage IIIB or stage IVA squamous cell carcinoma of the uterine cervix:

Prelyminari report of a Radiation Therapy Oncology Group randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13 (4): 541-49.

48. Colombo A, Landoni F, Cormio G, et al. Concurrent carboplatin/5FU and radiotherapy compared to radiotherapy alone in locally advanced cervical carcinoma: a case-control study. *Tumori* 1997; 83(6): 895-99.

49. Stehman FB, Bundy BN, Kucera PR, et al. Hydroxyurea, 5-fluorouracil infusion, and cisplatin adjunct to radiation therapy in cervical carcinoma: a phase I-II trial of the Gynecologic Oncology Group. *Gynecol Oncol* 1997; 66(2): 262-67.

50. Khoury GG, Bulman AS, Joslin CA and Rothwell RI. Concomitant pelvic irradiation, 5-fluorouracil and mitomycin in the treatment of advanced cervical carcinoma. *Br J Radiol* 1991; 64 (759): 252-60.

51. Grigsby PW, Graham MV, Perez CA, et al. Prospective phase I/II studies of definitive irradiation and chemotherapy for advanced gynecologic malignancies. *Am J Clin Oncol* 1996; 19(1): 1-6.

52. Souhami L, Seymour R, Roman TN, et al. Weekly cisplatin plus external beam radiotherapy and high dose rate brachytherapy in patients with locally advanced carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Biol Phys* 1993; 27: 871-78.

53. Lanciano RM, Pajack TF, Martz K and Hanks GE. The influence of treatment time on outcome for squamous cell cancer of the uterine cervix treated with radiation: a patterns-of-care study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25:391-97.

54. Perez CA, Grigsby P, Castro-Vita H and Lockett MA. Carcinoma of the uterine cervix. Impact on prolongation of overall treatment time and timing of brachytherapy on outcome of radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32 (5): 1275-88.

55. Preterit DG, Sarkaria JN, Chappell R, et al. The adverse effect of treatment prolongation in cervical carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 32 (5): 1301-07.

56. Rose P, Bundy BN, Watkins EB, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Eng J Med* 1999; 349: 1144-51.

57. Whitney CW, Sause , Bundy BN, et al. Randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxiurea as an adjunct to radiation therapy in stage IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Ginecologic Oncology Group and Souhwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 1999; 17 (5): 1339-48.

58. Keys HM, Bundy BN, Stheman FB, et al. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340: 1154-60.

59. Peters WA III, Liu PY, Barret RJ II, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high risk early stage carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol* 2000; 18: 1606-13.
60. Eifel PJ, Winter K, Morris M, et al. Pelvic irradiation with concurrent chemotherapy versus pelvic and para-aortic irradiation for high risk cervical cancer: an update of radiation therapy oncology group trial (RTOG) 90-01. *J Clin Oncol*, 2004; 22 (5): 872-80.
61. Pearcey R, Brundage M, Drouin P, et al. Phase III trial comparing concurrent radical radiotherapy with and without cisplatin chemotherapy in patients with advanced squamous cell cancer of the cervix. *J Clin Oncol* 2002; 20: 966-72.
62. Wallner KE, Li GC. Effect of cisplatin resistance on cellular radiation response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1987; 13: 587-91.
63. Withers HR, Taylor JMG and Maciejewski B. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during chemotherapy: *Acta Oncol* 1988; 27: 131-46.
64. Smalley SR, Kimler BF and Evans RG. 5-fluorouracil modulation of radiosensitivity in cultured human carcinoma cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 20 (2): 207-11.
65. Smalley SR, Kimler BF, Evans RG and Dalziel WC. Heterogeneity of 5-fluorouracil radiosensitivity modulation in cultured mammalian cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24(3): 519-25.
66. Omura GA. Chemotherapy for stage IVB or recurrent cancer of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1996; 21: 123-26.
67. Bonomi P, Blessing JA, Stehman FB, et al. Randomized trial of three cisplatin dose schedules in squamous-cell carcinoma of the cervix: A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1985; 3: 1079-85.
68. Curtin J, Lanciano RM and Kudelka A. Cervical cancer. In: Pazdur R, Coia L, Hoskins W and Wagman L. *Cancer management: a multidisciplinary approach*. PRP, Huntington (New York), 1998.
69. Vermorken JB, Zanetta G, De Oliveira CF et al. Randomized phase III trial of bleomycin and cisplatin versus single agent cisplatin in disseminated squamous cell carcinoma of the uterine cervix. An EORTC Gynecological Cancer Cooperative Group study. *Ann Oncol* 2001; 12 (7): 967-74.

70. Omura GA, Blessing JA, Vaccarello L, et al. Randomized trial of cisplatin versus cisplatin plus mitolactol versus cisplatin plus ifosfamide in advanced squamous carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1997; 15: 165-71.
71. Moore DH, McQuellon RP, Blessing JA, et al. A randomized phase III study of cisplatin plus paclitaxel in stage IVB, recurrent or persistent squamous cell carcinoma of the cervix: a GOG study. *Proceedings Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 201a (A 801).
72. Waggoner SE. Cervical cancer. *Lancet* 2003; 361: 2217-25.
73. Benda JA. Histopathologic prognostic factors in early stage cervical carcinoma. *Mongr Natl Cancer Inst* 1996; 21: 27-34.
74. Eifel PJ, Morris M, Wharton JT, et al. The influence of tumor size and morphology on the outcome of patients with FIGO stage IB squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994; 29: 9-16.
75. Burghardt E, Hofmann HM, Ebner F, et al. Magnetic resonance imaging in cervical cancer: a basis for objective classification. *Gynecol Oncol* 1989; 33 (1): 61-7.
76. Grimard L, Genest P, Girard A, et al. Prognostic significance of endometrial extension in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1988; 31 (2): 301-9.
77. Tanaka Y, Sawada S, Murata T, et al. Relationship between lymph node metastases and prognosis in patients irradiated postoperatively for carcinoma of the uterine cervix. *Acta Radiol* 1984; 23: 455- 59.
78. Delgado G, Bundy B, Zaino R, et al. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1990; 38: 352.
79. Kainz C, Gitsch G, Tempfer C, et al. Vascular space invasion and inflammatory stromal reaction as prognostic factors in patients with surgically treated cervical cancer stage IB to IIB. *Anticancer Res* 1994; 14: 2145.
80. Morris M. Management of stage IA cervical carcinoma. *Mongr Natl Cancer Inst* 1996; 21: 47-52.
81. Eifel PJ, Burke TW, Morris M, et al. Adenocarcinoma as an independent risk factor disease recurrence in patients with stage IB cervical carcinoma: *Gynecol Oncol* 1995; 59: 38-44.
82. Hopkins M, Morley GW. A comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1991; 77: 912.

83. Eifel PJ, Burke TW, Delclos L, et al. Early stage I adenocarcinoma of the cervix uterine: treatment results in patients with tumor < 4cms in diameter. *Gynecol Oncol* 1991; 41: 199.
84. Berek JS, Hacker NS, Fu YS, et al. Adenocarcinoma of the uterine cervix: histologic variables associated with lymph node metastasis and survival. *Obstet Gynecol* 1985; 65: 46.
85. Matthews CM, Burke TW, Tornos C, et al. Stage I cervical adenocarcinoma: prognostic evaluation of surgically treated patients. *Gynecol Oncol* 1993; 49: 19.
86. Raju K, Kjorstad KE, Abeler V. Prognostic factor in the treatment of stage IB adenocarcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet* 1991; 1: 69.
87. Hockel M, Schlenger K, Aral B, et al. Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res* 1996; 56: 4509-15.
88. Fyles AW, Milosevic M, Wong R, et al. Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer. *Radither Oncol* 1998; 48: 149-56.
89. Grogan M, Thomas GM, Melamed I, et al. The importance of hemoglobin levels during radiotherapy for carcinoma of the cervix. *Cancer* 1999; 86: 1528-36.
90. Kapp KS, Poschauko J, Geyer E, et al. Evaluation of the effect of routine packed red blood cell transfusion in anemic cervix cancer patients treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Biol Phys* 2002; 54: 58-66.
91. Pérez-Regadera J, Sotoca A, Murariu C, Sánchez-Muñoz A et al. La hemoglobina inicial como factor pronóstico en cáncer de cérvix avanzado. *XIII Congreso de la Sociedad Española de Radioterapia (AERO)*. Cádiz, Octubre 2005.
92. Dachs GU, Tozer GM: Hypoxia modulated gene expression: Angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1649-60.
93. Hemminki K, Li X and Mutanen P. Age-incidence relationships and time trends in cervical cancer in Sweden. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 323-28.
94. Kodama S, Kanazawa K, Honma S and Tanaka K. Age as a prognostic factor in patients with cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1992; 68 (11): 2481-85.
95. Hockel M, Schlenger K, Mitze M, et al. Tumor vascularity, a novel prognostic factor in advanced cancer of the uterine cervix. *Proc Soc Gynecol Oncol* 1995: 48
96. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, et al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 56: 353.

97. Hernández R, Heller PB, Whitney C, et al. Thrombocytosis in surgically treated stage IB squamous cell cervical carcinoma (a Gynecologic Oncology Group study). *Gynecol Oncol* 1994; 55: 328.
98. Lopes A, Daras V, Cross PA, et al. Thrombocytosis as a prognostic factor in women with cervical cancer. *Cancer* 1994; 74: 90.
99. Kristensen GB, Kaern J, Abeler VM, et al. No prognostic impact of flow-cytometric measured DNA ploidy and S-phase fraction in cancer of the uterine cervix: a prospective study of 465 patients. *Gynecol Oncol* 1995; 57: 79.
100. Ikenberg H, Wiegering I, Pfisterer, et al. Human papillomavirus DNA in tumor-free regional lymph nodes: a potential prognostic marker in cervical cancer. *Cancer J Sci Am* 1996; 2: 28.
101. Kobayashi Y, Yoshinouchi M, Tiangi G, et al. Presence of human papilloma virus DNA in pelvic lymph nodes can predict unexpected recurrence of cervical cancer in patients with histologically negative lymph nodes. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 979.
102. Modjtahedi H, Dean C. The receptor for EGF and its ligands: expression, prognostic value and target for therapy in cancer (review). *Int J Oncol* 1994; 4: 277.
103. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 127-37.
104. Zanke B. Growth factors and intracellular signalling. In: Tannock IF, Hill RP, editors. *The basic science of oncology*. New York: Mc Graw-Hill; 1998.
105. Arteaga CL. Epidermal growth factor dependence in human tumors: more than just expression?. *The Oncologist* 2002; 7(suppl 4): 31-9.
106. Salomon DS, Bradt R, Ciardello F and Normanno N. Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Rev Oncol/Hematol* 1995; 19: 183-232.
107. Olayioye M, Neve R, Lane H, et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000; 19: 3159-67.
108. Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20(suppl 18): 1-13.
109. Mendelsohn J and Baselga J. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2002; 14: 2787-99.
110. Ciardiello F, Caputo R, Bianco R, et al. Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in humans cancer cells by ZD-1839, an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2053-63.

111. Chung KY, Shia J, Kemeny NE, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23(9): 1803-10.
112. Baselga J, Trigo JM, Bournis J, et al. Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy in patients with platinum-refractory metastatic and/or recurrent squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5568-77.
113. Pfeiffer D, Stellwag B, Pfeiffer A, et al. Clinical implications of the epidermal growth factor receptor in the squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*, 1989; 33: 146-50.
114. Hayashi Y, Hachisuga T, Iwasaka T, et al. Expression of ras oncogen product and EGF receptor in cervical squamous cell carcinomas and its relationship to lymph node involvement. *Gynecol Oncol*, 1991; 40:147-50.
115. Hale RJ, Buckley CH, Gullick WJ, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in cervical carcinoma. *J Clin Pathol*, 1993; 46:149-53.
116. Kristensen GB, Holm R, Abeler VM and Tropé CG. Evaluation of the prognosis significance of cathepsin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma. *Cancer*, 1996;78(3): 433-440.
117. Oka K, Nakano T and Arai T. Expression of cathepsin D and epidermal growth factor in stage III cervical carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*, 1997; 7: 122-6.
118. Scambia G, Ferrandina G, Distefano M, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is not related to the prognosis of cervical cancer. *Cancer Lett*, 1998; 123:135-9.
119. Hove MG, Dinh TV, Hannigan EV, Lucci JA 3rd, Chopra V, Smith ER, To T. Oncogene expression and microvessel count in recurrent and nonrecurrent stage Ib squamous cell carcinoma of the cervix. *J Reprod Med*, 1999; 44: 493-6.
120. Kersermaekers AF, Fleuren GJ, Kenter GG, et al. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res*, 1999; 5: 577-86.
121. Ngan H, Cheung A, Cheng D, et al. Abnormal expression of the epidermal growth factor receptor and c-erbB2 in squamous cell carcinoma of the cervix: correlation with human papillomavirus and prognosis. *Tumor biol*, 2001; 22: 176-83.
122. Oh MJ, Choi JH, Kim IO, et al. Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2000; 6: 4760-63.

123. Kim YT, Park SW, Kim JW. Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2002; 87:84-89.
124. Gaffney DK, Haslam D, Tsodikov A, et al. Epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2003; 4: 922-28.
125. Lee CM, Lee RJ, Hammond E, et al. Expression of Her2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 209-14.
126. Xu Y, Richert N, Ito S, et al. Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7308-12.
127. Auvinen E, Crusius K, Steuer B, Alonso A. Human papillomavirus type 16 E5 protein. *Int J Oncol* 1997; 11: 1297-1304.
128. Pim D, Collins M, Banks L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor. *Oncogene* 1992; 7: 27-32.
129. Straight SW, Herman B, Mc Cance DJ. The oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. *J Virol* 1995; 69: 3185-92.
130. Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, et al. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232: 1644-46.
131. Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM and Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signalling. *EMBO J* 1997; 16: 1647-55.
132. Tzahar E, Waterman H, Chen X et al. A hierarchinal network of interreceptor interactions determines signal transduction by neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 5276-87.
133. Slamon D, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the Her-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; 244: 707-12.
134. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, et al. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cell transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 24: 85-95.

135. Chazin VR, Kaleko M, Miller AD and Slamon DJ. Transformation mediated by the human HER-2 gene independent of epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 1992; 7: 1859-66.
136. Hudziak RM, Schlessinger J, Ullrich A. Increase expression of the putative growth factor receptor p185 causes transformation and tumorigenesis of HIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7159-63.
137. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-92.
138. Berns EMJJ, Foekens JA, van Staveren IL, et al. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment. *Gene* 1995; 159: 11-18.
139. Newby JC, Johnson SRD, Smith IE, Dowset M. Expression of epidermal growth factor and c-erbB-2 during the development tamoxifen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 1643-51.
140. Elledge RM, Green S, Ciocca D, et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 7-12.
141. Budman DR, Berry DA, Cirincione CT, et al. Dose and dose-intensity as determinants of outcome in the adjuvant treatment of breast cancer: The Cancer and Leukemia Group B. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1205-11.
142. Muss HB, Thor AD, Berry DA, et al. c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node positive early breast cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 1260-66.
143. Paik S, Bryant J, Park C, et al. erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1361-70.
144. Thor AD, Berry DA, Budman DR, et al. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1346-60.
145. Hynes NE and Stern DF. The biology of c-erbB-2/neu/HER2 and its role in cancer. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1198: 165-84.
146. Berchuck A, Rodríguez G, Kamel A, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva and vagina. *Obstet Gynecol* 1990; 79: 381-87.

147. Hale RJ, Buckley CH, Fox H and Williams J. Prognostic value of c-erbB2 expression in uterine cervical carcinoma. *J Clin Pathol* 1992; 45: 594-96.
148. Kuniyuki O, Nakano T and Arai T. c-erbB-2 oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer* 1994; 73(3): 668-71.
149. Mandain M, Konishi I, Koshiyama M, et al. Altered expression of nm23-H1 and c-erbB-2 proteins have prognostic significance in adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1994; 75 (10): 2523-29.
150. Kihana T, Tsuda H, Teshima S et al. Prognostic significance of the overexpression of c-erbB2 protein in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1994; 73(1): 148-53.
151. Costa M, Walls J and Trelford JD. c-erbB-2 oncoprotein overexpression in uterine cervix cancer carcinoma with glandular differentiation. *Am J Clin Pathol* 1995; 104: 634-43.
152. Wong YF, Chung TKH, Cheung TH, et al. Her-2/neu gene amplification in cervical cancer in Chinese women of Hong Kong and China. *J Obstet Gynaecol Res* 1996; 22(2): 171-75.
153. Ndubisi B, Sanz S, Lu L, et al. The prognostic value of Her-2/neu oncogene in cervical cancer. *Ann Clin Lab Sci* 1997; 27(6): 396-401.
154. Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S. Correlation of cervical carcinoma c-erbB-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer* 1997; 79(3): 513-20.
155. Nevin J, Laing D, Kaye P, et al. The significance of c-erbB-2 immunostaining in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 354-58.
156. Heller DS, Hameed M, Aisner S et al. Demonstration of Her-2 protein in cervical carcinomas. *Journal of Lower Genital Tract Disease* 2003; 7(1): 47-50.
157. Niibe Y, Nakano T, Ohno T, et al. Prognostic significance of c-erbB-2/HER2 expression in advanced uterine cervical carcinoma with para-aortic lymph node metastasis treated with radiation therapy. *Int J Gynecol Cancer* 2003; 13: 849-55.
158. Dose and volume specification for reporting intracavitary therapy in gynaecology, ICRU report 38. Bethesda, MD: International Commission on Radiation Units and Measurements, 1985.

159. National Cancer Institute: NCI Clinical Announcement. Bethesda, MD, United States Department of Health and Human Services. Public Health Service, National Institute of Health, February 1999.
160. Hsu SM, Raine L, Fouger H.A. A comparative study of the peroxidase – antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polipeptide hormones with radioimmuno assay antibodies. *Am J Clin Pathol* 1981; 75: 734-738.
161. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29 (4): 577-80.
162. Martin-Loeches M, Ortí RM, Cazorla E, Asinsa E, Llixiona J. Multivariate analysis of the morphometric characteristics of tumours as prognostic factors in the survival of patients with uterine cervix cancer treated with radical surgery. *Eur. J. f Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2002; 105: 170–176.
163. Bolli JA, Maners A. Age as a prognostic factor in cancer of the cervix: the UAMS experience. *J Ark Med Soc* 1992; 89: 79-83.
164. Borowsky MA, Elliott KS, Pezzullo JC, et al. A retrospective review of 15 years of radical radiotherapy with or without concurrent cisplatin and/or 5-fluorouracil for the treatment of locally advanced cervical cancer. *Bull Cancer* 2005; 92 (2): 19-24.
165. Fyles AW, Pintilie M, Kirkbride P, Levin W, Manchul LA, Rawlings GA. Prognostic factors in patients with cervix cancer treated by radiation therapy: results of a multiple regression analysis. *Radiother Oncol* 1995; 35(2):107-17.
166. Sheridan MT, O'Dwyer T, Seymour CB and Mothersill CE. Potential indicators of radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiat Oncol Investig* 1997; 5: 180-6.
167. Akimoto T, Hunter NC, Buchmiller L, Mason K, Ang KK and Milas L. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2884-90.
168. Giralt J, de las Heras M, Cerezo L, et al. The expression of epidermal growth factor receptor results in a worse prognosis for patients with rectal cancer treated with preoperative radiotherapy: a multicenter, retrospective analysis. *Radiother Oncol* 2005; 74(2): 101-8.
169. Gupta AK, McKenna WG, Weber CN, et al. Local recurrence in head and neck cancer: relationship to radiation resistance and signal transduction. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 885-92.

170. Ang KK, Berkey BA, Tu X, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 7350-56.
171. Ling YH, Donato NJ, Perez-Soler R. Sensitivity to topoisomerase I inhibitors and cisplatin is associated with epidermal growth factor receptor expression in human cervical squamous carcinoma ME180 sublines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 47(6): 473-80.
172. Dixit M, Yang JL, Poirier MC, Andrews PA and Arteaga CL. Abrogation of cisplatin-induced programmed cell death in human breast cancer cells by epidermal growth factor antisense RNA. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(5): 365-7.
173. Frankel A and Mills GB. Peptide and lipid growth factors decrease cis-diamminedichloroplatinum-induced cell death in human ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1307-13.
174. Knecht R, Peters S, Adunka O, et al. Carcinomas unresponsive to either cisplatin or anti-EGFR therapy can be growth inhibited by combination therapy of both agents. *Anticancer Res* 2003 ; 23(3B): 2577-83.
175. Fisher-Colbrie J, UIT A, Heinzl H, et al. EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer Res* 1997; 17: 613-9.
176. Scambia G, Benedetti-Pacini P, Ferrandina G, et al. Epidermal growth factor, oestrogen and progesterone receptor expression in primary ovarian cancer: correlation with clinical outcome and response to chemotherapy. *Br J Cancer* 1995; 72: 361-6.
177. Akamatsu M, Matsumoto T, Oka K, et al. c-erbB-2 oncoprotein expression related to chemoradioresistance in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Radiation Biol Phys* 2003; 57: 1323-27.
178. Pietras RJ, Poen JC, Gallardo D, et al. Monoclonal antibody to Her-2/*neu* receptor modulates repair of radiation induced DNA damage and enhances radiosensitivity of human breast cancer cells overexpression this oncogene. *Cancer Res* 1999; 59: 1347-55.
179. Tsai CM, Chang Yu D, Wu LH, et al. Enhanced chemoresistance by elevation of the levels of p185 neu in the Her-2/*neu* transfected human lung cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 682-84.
180. Tsai CM, Chang KT, Li L, et al. Interrelationships between cellular nucleotide excision repair, cisplatin cytotoxicity, Her2/*neu* gene expression, and epidermal growth

- factor receptor level in non-small lung cancer cells lines. *J Cancer Res* 2000; 91: 213-222.
181. Pergram MD, Finn RS, Arzoo K, et al. The effect of Her2/neu overexpression on chemotherapeutic drug sensitivity in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1997; 15: 537-47.
 182. Hancock CM, Langton BC, Chan T, et al. A monoclonal antibody against the c-erbB-2 protein enhances the cytotoxicity of cis-diamminedichloroplatinum against human breast and ovarian tumor cell lines. *Cancer Res* 1991; 51(17): 4575-80.
 183. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, et al. Differential endocytic routing of homo-and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. *EMBO J* 1998; 17: 3385-97.
 184. Kokai Y, Myers JN, Wada T, et al. Synergistic interaction of the p185c-neu and the EGF receptor leads to transformation of rodent fibroblasts. *Cell* 1989; 58: 287-92.
 185. Alimandi M, Romano A, Curia MC, et al. Cooperative signaling of ErbB3 and ErbB2 in neoplastic transformation and human mammary carcinomas. *Oncogene* 1995; 10: 1813-21.
 186. Zhang K, Sun J, Liu N, et al. Transformation of NIH 3T3 cells by Her2 or Her4 receptors requires the presence of Her1 or Her2. *J Biol Chem* 1996; 271: 3884-90.
 187. Cohen BD, Green JM, Foy L and Fell HP. Her4 mediated biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem* 1996; 1996; 271: 4813-18.
 188. Qian X, Dougall WC, Hellman ME, et al. Kinase-deficient neu proteins suppress epidermal growth factor receptor function and abolish cell transformation. *Oncogene* 1994; 9: 1507-14.
 189. Grauss-Porta D, Beerli RR, Hynes NE. Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1182-95.
 190. Motoyama AB, Hynes NA, Lane HA, et al. The efficacy of ErbB receptors-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor receptors peptides. *Cancer Res* 2002; 62: 3151-58.
 191. Ye D, Mendelsohn J and Fanz Z. Augmentation of a humanized anti-Her2 mAb 4D5 induced growth inhibition by a human-mouse chimeric anti-EGF receptor mAb C225. *Oncogene* 18; 1999; 731-38.

192. Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, et al. The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits Her2-driven signaling and suppresses the growth of Her2-overexpressing tumors cells. *Cancer Res* 2001; 61: 7184-88.
193. Moulder SL, Yakes M, Muthuswamy SK, et al. Epidermal growth factor receptor (Her1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits Her2/Neu (erb-2)-overexpressing breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2001; 61: 8887-95.
194. Normanno N, Campiglio M, De Luca A, et al. Cooperative inhibitory effect of ZD1839 (Iressa) in combination with trastuzumab on human breast cancer cell growth. *AnnOncol* 2002; 13: 65-72.
195. Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, et al. Epidermal growth factor receptor and Her2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer is correlated with survival. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1850-55.
196. Tateishi M, Ishida T, Kohdono S, et al. Prognostic influence of the co-expressing of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 protein in human lung adenocarcinoma. *Surgical Oncology* 1994; 8: 109-113.
197. DiGiovanna MP, Stern DF, Edgerton SM, et al. Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1152-60.
198. Suo Z, Risberg B, Kalsson MG, et al. EGFR family expression in breast carcinomas. c-erbB-2 and c-erbB-4 receptors have different effects on survival. *J Pathol* 2002; 196: 17-25.
199. Harris AL, Nicholson S, Sainsbury JRC, et al. Epidermal growth factor receptors in breast cancer: association with early relapse and death, poor response to hormones and interactions with neu. *J Steroid Biochem* 1989; 34: 123-31.
200. Chow NH, Chan SH, Tzai TS, et al. Expression profiles of ErbB family receptors and prognosis in primary transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1957-62.
201. Lee JC, Wang ST, Chow NH and Yang HB. Investigation of the prognostic value of coexpressed erbB family members for the survival of colorectal cancer patients after curative surgery. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1065-71.
202. Xia W, et al. Combination of EGFR, Her2/neu and Her3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4164-74.

203. Lanciano R, Calkins A, Bundy BN, et al. Randomized comparison of weekly cisplatin or protracted venous infusion of fluorouracil in combination with pelvic radiation in advanced cervix cancer: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8289-95.
204. Aboud-Pirak E, Hurwitz E, Pirak ME, et al. Efficacy of antibodies to epidermal growth factor receptor against KB carcinoma in vitro and in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 1605-11.
205. Fan Z, Baselga J, Masui H, et al. Antitumor effect of antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus *cis*-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res* 1993; 53: 4637-42.
206. Huang SM, Bock JM, and Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59: 1935-40.
207. Milas L, Mason K, Hunter N, et al. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 antiepidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 701-8.
208. Diermeier S, Horváth G, Knuechel-Clarke R, et al. Epidermal growth factor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in her2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Experimental Cell Research* 2005; 304: 604-19.
209. Zhou H, Kim Y-S, Peletier A, et al. Effects of the EGFR/Her2 kinase inhibitor GW572016 on EGFR and Her2 overexpressing breast cancer cell line proliferation, radiosensitization, and resistance. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 2003; 58: 344-52.
210. Baselga J and Arteaga C. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23 (11): 2445-59.

Anexo I. Publicaciones relacionadas con la tesis
